

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 847**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/575** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

**A23L 1/0528** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2004 E 04737755 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 1644007**

54 Título: **Composición que comprende uno o más fitoesteroles y/o fitoestanoles y glucomanano y usos de la composición para tratar trastornos de lípidos en individuos con y sin diabetes de tipo II**

30 Prioridad:

**31.05.2003 US 449729**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**22.03.2013**

73 Titular/es:

**PHARMACHEM LABORATORIES, INC. (100.0%)  
265 Harrison Avenue  
Kearny New Jersey 07032, US**

72 Inventor/es:

**ZAWISTOWSKI, JERZY y  
JONES, PETER J.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 398 847 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición que comprende uno o más fitoesteroles y/o fitoestanoles y glucomanano y usos de la composición para tratar trastornos de lípidos en individuos con y sin diabetes de tipo II.

### Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones útiles a campo de trastornos de lípidos.

### Antecedentes de la invención

10 Aunque recientes avances en la ciencia y la tecnología ayudan a mejorar la calidad y añadir años a la vida humana, la prevención de la aterosclerosis, la causa subyacente de la enfermedad cardiovascular ("CVD") todavía no ha sido suficientemente abordada. De hecho, las enfermedades cardiovasculares suponen más muertes al año que cualquier otra enfermedad, incluidas todas las formas de cánceres combinadas<sup>1</sup>. Solamente en los EE.UU., se producen más de un millón de ataques cardíacos cada año y más de medio millón de personas mueren como consecuencia. Esta enorme tasa ha necesitado una investigación continuada para determinar las causas de la CVD y los medios mediante los cuales puede ser prevenida y tratada.

15 La causa primaria de la CVD es la aterosclerosis, una enfermedad caracterizada por el depósito de lípidos, incluido el colesterol, en la pared del vaso arterial, dando lugar a un estrechamiento de los pasos de los vasos y finalmente a un endurecimiento del sistema vascular. La aterosclerosis es un procedimiento degenerativo que resultan de una combinación de factores heredados (genéticos) y factores medioambientales como la dieta y el estilo de vida. La investigación hasta la fecha sugiere que el colesterol puede desempeñar una función en la aterosclerosis formando placas ateroscleróticas en los vasos sanguíneos, cortando finalmente el suministro de sangre al músculo cardíaco o, 20 alternativamente, al cerebro o las extremidades, dependiendo de la ubicación de la placa en el árbol arterial<sup>1,2</sup>. Un colesterol total por encima de 225-250 mg/dl, está asociado con un riesgo significativamente elevado de CVD, que incluye la enfermedad vascular. Hay estudios que indican que una reducción de un 1% en el colesterol en suero total de una persona produce una reducción de un 2% en el riesgo de un acontecimiento de las arterias coronarias<sup>4</sup>. Estadísticamente, una disminución de 10% en el colesterol en suero medio (por ejemplo de 6,0 mmol/l a 5,3 mmol/l) 25 puede dar lugar a la prevención de 10.000 muertes en los estados unidos al año<sup>5</sup>.

30 Los ésteres de colesterilo son un componente principal de las lesiones ateroscleróticas y la forma de almacenamiento principal del colesterol en la células de las paredes arteriales. La formación de ésteres de colesterilo es también una etapa en la absorción intestinal de colesterol de la dieta a través de mecanismos de control homeostático. Estos mecanismos de control incluyen la regulación inter-relacionada del colesterol de la dieta, la biosíntesis de colesterol y el catabolismo de lipoproteínas en plasma que contiene colesterol. La biosíntesis y el catabolismo del colesterol se producen principalmente en el hígado y, por tanto son una causa determinante primaria de los niveles de colesterol en plasma.

35 Las lipoproteínas son complejos de lípidos y proteínas conjuntamente mantenidos mediante enlaces no covalentes. Cada tipo de clase de lipoproteína tiene una masa, composición química, densidad y función fisiológica características. Independientemente de la densidad o tamaño de partículas, los lípidos en circulación consisten en un núcleo de ésteres de colesterilo y triglicéridos y una envoltura de fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas. Las apolipoproteínas están involucradas en la estructuración y la secreción de la lipoproteína, proporcionan integridad estructural, activan enzimas modificadoras de lipoproteínas y son el ligando para una gran selección de receptores y proteínas de membranas. Las clases de lipoproteínas que se encuentran en el plasma incluyen HDL, 40 LDL, lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL).

45 Cada tipo de lipoproteína tiene una composición o relación característica de apolipoproteínas. La apolipoproteína más predominante en HDL es apolipoproteína-AI (apo-AI) que supone aproximadamente un 70% de la masa de proteínas, y la apo-AII supone otro 20%. La relación de apo-AI respecto a apo-AII puede determinar las propiedades funcionales y anti-aterogénicas de HDL. Las partículas de HDL en circulación consisten en una mezcla heterogénea de partículas discoidales y esféricas con una masa de 200 a 400 kilo-dáltones y un diámetro de 7 a 10 nm.

50 La HDL es una de las clases principales de lipoproteínas que funcionan en el transporte de lípidos en plasma y tienen múltiples funciones en el cuerpo, incluido el transporte de colesterol inverso, que proporciona el sustrato de la molécula de colesterol para la síntesis de ácido de bilis, transporte de clusterina, transporte de paraoxanasa, prevención de la oxidación de lipoproteínas y absorción selectiva de colesterol por células adrenales. Los lípidos principales asociados con HDL incluyen colesterol, éster de colesterilo, triglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos. La HDL es anti-aterogénica.

55 El procedimiento aterosclerótico comienza cuando las LDL resultan atrapadas en la pared vascular. La oxidación de esta LDL da lugar a la unión de monocitos a las células endoteliales que recubren la pared del vaso. Estos monocitos son activados y se desplazan en el espacio endotelial en el que son transformados en macrófagos, conduciendo a una oxidación adicional de la LDL. La LDL oxidada es absorbida a través del receptor depurador en el macrófago, conduciendo a la formación de células espumosas. Se genera un tapón fibroso a través de la proliferación y desplazamiento de células de músculos lisos arteriales, creando así una placa aterosclerótica.

La HDL es esencial para el transporte de colesterol desde tejidos extra-hepáticos al hígado en el que es excretado en forma de bilis como colesterol libre o como ácido biliares que se forman a partir del colesterol. El procedimiento requiere varias etapas. La primera es la formación de partículas de HDL nacientes o pre-beta en el hígado y el intestino. El colesterol en exceso se desplaza a través de las membranas celulares en la HDL naciente a través de la acción del transportador ABCA. La lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) convierte el colesterol en éster de colesterilo y la posterior conversión de HDL naciente en HDL madura. El colesterol esterificado es seguidamente transferido por colesterol éster de proteína de transferencia (CETP) desde la HDL hasta lipoproteínas que contienen apolipoproteína B, que son absorbidas por numerosos receptores en el hígado. La HDL naciente es regenerada a través de lipasa de triglicéridos hepáticos y proteína de transferencia de fosfolípidos y el ciclo continúa. Además del colesterol separado por células periféricas, la HDL acepta colesterol de LDL y membranas de eritrocitos. Otro mecanismo para el transporte de colesterol inverso puede incluir la difusión pasiva de colesterol entre membranas con escaso contenido de colesterol y HDL u otras moléculas aceptoras.

La HDL protege contra el desarrollo de la aterosclerosis a través de su función en el transporte de colesterol inverso y la posibilidad de impedir la oxidación de LDL. Diversas enzimas asociadas con HDL están implicadas en el procedimiento. La paroxonasa (PON1), LCAT y el factor de activación de plaquetas acetilhidrolasa (PAFAH) participan todos hidrolizando hidroperóxidos de fosfolípidos generados durante la oxidación de LDL y actúan en Tandem para evitar la acumulación de lípidos oxidados en LDL. Estas enzimas son responsables de las propiedades anti-oxidantes y anti-inflamatorias de HDL. Hay estudios que han mostrado que una baja concentración en plasma de HDL-colesterol es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de aterosclerosis y que los niveles elevados son protectores.

El hígado es el órgano principal responsable de la síntesis y secreción de VLDL que, como se indicó anteriormente son metabolizadas en forma de LDL en circulación. Las LDL son el colesterol predominante que porta lipoproteínas en plasma y, por tanto, un aumento en su concentración se correlaciona directamente con la aterosclerosis. Expuesta de forma simple, cuando se reduce la absorción de colesterol intestinal, por cualquier medio, se suministra menos colesterol al hígado. Como consecuencia, se reduce la producción de VLDL y hay un aumento simultáneo de la desaparición hepática de colesterol en plasma, principalmente en la forma de LDL.

Consecuentemente, el colesterol actúa sobre tres niveles diferentes para regular su propia síntesis. En primer lugar, suprime la síntesis de colesterol endógeno inhibiendo a la enzima HMG CoA reductasa. En segundo lugar, activa LCAT. En tercer lugar regula la síntesis del receptor de LDL asegurando que una célula que ya tiene una cantidad suficiente de colesterol no absorberá colesterol adicional.

Los esteroides son compuestos que se producen de forma natural que realizan muchas funciones celulares críticas. Los fitoesteroides como el campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol en vegetales, el hergosterol en hongos y el colesterol en animales son cada uno componentes primarios de las membranas celulares y sub-celulares en sus respectivos tipos de células. La fuente dietética de los fitoesteroides en seres humanos procede de materiales vegetales, por ejemplo, verduras y aceites vegetales. El contenido diario estimado de fitoesterol en la dieta de tipo occidental convencional es de aproximadamente 60-80 miligramos en contraste con una dieta vegetariana, que proporcionaría aproximadamente 500 miligramos al día.

Los fitoesteroides han recibido una considerable atención debido a su capacidad para disminuir los niveles de colesterol en suero cuando son suministrados como alimentos a un cierto número de especies de mamíferos, incluidos seres humanos. Aunque el mecanismo preciso de acción continúa siendo ampliamente desconocido, la relación entre el colesterol y los fitoesteroides se debe aparentemente, en parte, a las similitudes entre las respectivas estructuras químicas (produciéndose las diferencias en las cadenas laterales de las moléculas). Se supone que los fitoesteroides desplazan el colesterol de la fase micelar y, por tanto, reducen su absorción, o, posiblemente, compiten con sitios de receptores y/o portadores en el procedimiento de absorción de colesterol.

Desde hace cuarenta años, la empresa Eli Lilly comercializó una preparación de esteroides a partir de aceite de resina y posteriormente a partir de aceite de soja denominado Cytellin® que se encontró que rebajaba el colesterol en suero en aproximadamente 9% según un informe<sup>6</sup>. Diversas investigaciones posteriores han explorado los efectos de preparaciones de sitosterol sobre las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en plasmas y los efectos de sitosterol y campesterol a partir de fuentes de aceite de soja y de resina sobre esteroides<sup>8</sup> en suero. Una composición de fitoesteroides que se encontró que era considerablemente efectiva para rebajar el colesterol en suero se describe en la patente de EE.UU. n° 5.770.749 de Kutney et al. y comprende no más de 70% en peso de beta-sitosterol, al menos 10% en peso de campesterol y estigmasterol (beta-sitostanol). Se apreció en esta patente que hay una forma de sinergia entre los fitoesteroides constituyentes, proporcionando resultados de disminución de colesterol incluso mejores de los que habían sido previamente concebidos.

Se han desarrollado muchos compuestos y composiciones basados en fitoesteroides durante la última década, con el objetivo de rebajar el colesterol de LDL en suero, aumentar el colesterol de HDL en suero y prevenir otros factores de riesgo significativos para CVD.

La diabetes mellitus es un trastorno primario heterogéneo del metabolismo de hidratos de carbono con múltiples factores etiológicos que incluyen generalmente deficiencia de insulina o resistencia a la insulina o ambas. La

diabetes mellitus de tipo 1, o de aparición juvenil, o dependiente de insulina, está presente en pacientes con poca o ninguna capacidad secretora de insulina endógena. Estos pacientes desarrollan hiperglicemia extrema (acumulación de glucosa en la corriente sanguínea) y son completamente dependientes de una terapia de insulina exógena para una supervivencia inmediata. La diabetes mellitus de tipo 2 también denominada de aparición adulta o no dependiente de la insulina ("MIDDM"), se produce en pacientes que retienen alguna capacidad secretora de insulina endógena, sin embargo, la gran mayoría de ellos son deficientes en insulina y resistentes a la insulina. La resistencia a la insulina puede ser debida a una insuficiente expresión de receptores de insulina, afinidad reducida de unión a insulina o cualquier anomalía en cualquier etapa a lo largo de la trayectoria señalizadora de insulina.

La diabetes mellitus es una de las causas principales de mortalidad y morbilidad en el mundo. Solamente en los EE.UU., la enfermedad afecta acerca de 5% de la población de los EE.UU. y aproximadamente un 10% de los que tienen una edad por encima de 60. Se ha estimado que hay aproximadamente 12 millones de diabéticos en los EE.UU. diagnosticados y sin diagnosticar. Esta cifra crece anualmente y, solamente en la última década, los EE.UU. han observado una elevación enorme de 33% en diabetes asociada a una obesidad creciente y estilo de vida inapropiado. Merece la pena apreciar que en gran medida el mayor porcentaje (90%) de diabéticos tiene la variedad de tipo 2.

La diabetes mellitus afecta también a más de 30 millones de personas en china y el número de diabéticos está aumentando en un 5% por año. Tan solo aproximadamente un 5% son diabéticos de tipo 1, teniendo el resto la variedad de tipo 2.

Los hidratos de carbono de los alimentos son descompuestos en el intestino en glucosa y otros azúcares simples. Estos azúcares son absorbidos en la corriente sanguínea y trasladados (junto con otros nutrientes) a todas las células del cuerpo. Pero con el fin de absorber la glucosa de la sangre, las células necesitan insulina, una hormona producida en el páncreas. El páncreas, una glándula grande ubicada detrás del estómago, tiene múltiples funciones. Produce enzimas digestivas, proteínas que ayudan a descomponer los alimentos en el intestino. Contiene también grupos especializados de células denominadas "islotos de Langerhans". Estas células de islotos son de diversos tipos, produciendo cada uno una hormona diferente. Hay dos hormonas principales que regulan los niveles de glucosa en sangre, insulina y glucagón. Ambas son producidas en los islotos de Langerhans, el glucagón por células alfa y la insulina por células beta.

A medida que la glucosa se extiende en la corriente sanguínea después de una comida, el nivel de glucosa en sangre en elevación indica que las células beta secretan insulina. La insulina (junto con la glucosa) es trasladada mediante la corriente sanguínea hasta las células por todo el cuerpo. Diversos tejidos corporales, especialmente los músculos, hígado y grasas, tienen moléculas especializadas denominadas receptores de insulina en sus superficies celulares. La insulina se une a estos receptores, como una llave en una cerradura, abriendo canales que permiten que la glucosa entre en las células.

Una vez que la glucosa está en el interior de las células, puede ser usada con fines de energía y crecimiento. La glucosa en exceso es almacenada en el hígado en la forma de un hidrato de carbono complejo denominado glicógeno. Al mismo tiempo, a medida que caen los niveles de glucosa en sangre, se ralentiza la secreción de insulina. Cuando el nivel de glucosa en sangre comienza a ser bajo, indica a las células alfa que secreten glucagones, una hormona de péptido. El glucagón, a su vez, indica al hígado que convierta nuevamente glicógeno en glucosa, un procedimiento denominado glicogenolisis. Esto evita que el nivel de glucosa en sangre caiga demasiado bajo para asegurar que las células del cuerpo tienen un suministro estacionario de glucosa entre comidas. El glucagón estimula también el hígado para producir nueva glucosa a partir de otros nutrientes, como aminoácidos, (bloques constructores de proteínas) mediante un procedimiento denominado gluconeogénesis, asegurando así una fuente de reserva de glucosa hasta la siguiente comida.

La interacción de glucosa, insulina y glucagón asegura normalmente que los niveles de glucosa en sangre permanecen dentro de ciertos límites. Sin embargo, con individuos diabéticos, este equilibrio delicado se altera.

Hasta la fecha, la insulina es el modo principal de terapia en todos los pacientes con diabetes de tipo 1 y en muchos con tipo 2.

La diabetes de tipo 2 comienza habitualmente en edad adulta (normalmente después de 40 años, pero se produce también en personas más jóvenes). Generalmente, en personas que tienen este estado, el páncreas produce insulina pero las células del cuerpo son incapaces de responder eficazmente a esto. Esto se denomina resistencia a la insulina. Una persona puede tener resistencia a la insulina sin diabetes, en la medida en que haya suficiente insulina para superar la resistencia. Pero si la resistencia a la insulina continúa aumentando y/o la producción de insulina cae por debajo de la cantidad necesaria para compensar, se desarrollará la diabetes.

La mayoría de las diabetes de tipo 2 pueden ser tratadas con medicaciones orales que impulsan la secreción de insulina pancreática y/o disminuyen la resistencia a la insulina. Pero a lo largo del tiempo, las células beta pancreáticas pueden resultar cada vez menos capaces de responder, secretando así menos insulina cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados. Finalmente, la persona puede necesitar inyecciones de insulina para ayudar a regular los niveles de glucosa en sangre.

La tolerancia anormal a la glucosa y la resistencia a la insulina están relacionadas con múltiples factores de riesgo cardiovasculares, especialmente HDL reducida, triglicéridos en plasmas elevados e hipertensión<sup>9</sup>. Cuando se asocian, estas anomalías aumentan el riesgo de morbilidad y mortalidad de CVD, un efecto que es dependiente de otros factores de riesgo<sup>10</sup>. La hiperglicemia y la diabetes son ambos factores de riesgos independientes significativos para la mortalidad CVD<sup>11</sup>. Como las personas con diabetes tienen casi el doble de riesgo de morir de CVD que las de la población general de los EE.UU.<sup>12</sup>, la regulación de niveles de glucosa elevados y factores de riesgo de CVD significativos representa el planteamiento más eficaz para la prevención<sup>13</sup>.

Consecuentemente, el control de los factores de riesgo de CVD, incluidos el colesterol en suero es crítico para individuos tanto diabéticos como no diabéticos.

10 El documento US6365176 describe complementos nutritivos para pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 para lipodistrofia que comprende 0,5-1 g de manano de konjac y 0,5-4 g de esteroles de vegetales.

El documento WO 03/ 024237 describe una composición de aceite que comprende 0-5% de konjac y 0-10% de fitoesterol.

15 El documento EP1302113 describe alimentos o cosméticos fisiológicamente funcionales que contienen esfingoglicolípidos y procedimientos para su preparación.

El documento WO 02/082929 describe composiciones que comprenden  $\beta$ -glucanos y esteroides y/o estanoles de vegetales.

El documento JP2003113394 describe el uso de un extracto de la raíz tuberosa de lengua del diablo que comprende konjac y un esteroles de vegetales derivado del mismo.

## 20 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona una composición para su incorporación en alimentos, bebidas, complementos nutritivos o vitamínicos y nutracéuticos, que comprende uno o más fitoesteroides y/o fitoestanoles y, adicionalmente, glucomanano, en que el fitoesterol y/o el fitoesterol en la composición comprenden 67,3% de sitoesterol, 10,0% de sitoestanol, 8,2% de campesterol, 1,6% de campestanol y 12,1% de otros componentes.

25 La presente invención proporciona adicionalmente un uso como se define en la reivindicación 4.

Se ha encontrado que las composiciones de la presente invención exhiben una actividad superior para el tratamiento o la prevención de CVD y sus estados subyacentes, particularmente en uno o más de los siguientes: disminución del colesterol de LDL en suero, aumento del colesterol de HDL en suero y aumento de triglicéridos en suero. Puede haber al menos un profiláctico aditivo y/o efecto de tratamiento en todos estos aspectos. De forma igualmente importante, se cree que cuando los componentes de esta composición se combinan, se puede necesitar una dosis inferior de cada componente seleccionado para conseguir estos efectos deseados. Esto es importante debido a los efectos secundarios documentados de una administración masiva de glucomanano. Estos efectos y otras ventajas significativas resultarán evidentes en la memoria descriptiva que sigue.

30

## **Breve descripción de los dibujos**

35 La Figura 1 es un gráfico que muestra los cambios semanales en los niveles totales de colesterol;

La Figura 2 es un gráfico que muestra los cambios semanales en los niveles de colesterol de lipoproteínas de baja densidad;

La Figura 3 es un gráfico que muestra los cambios de glucosa en sangre durante un ensayo de tolerancia a la glucosa de 500 mg y de 2 horas.

## 40 **Realizaciones preferidas de la invención**

La siguiente descripción detallada se proporciona para ayudar a los expertos en la técnica a poner en práctica la presente invención. Sin embargo, esta descripción detallada no debe ser concebida para limitar indebidamente el alcance de la presente invención. Se pueden hacer modificaciones y variaciones de las realizaciones expuestas en la presente memoria descriptiva por los expertos en la técnica.

45 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "animal" representa cualquier miembro del reino animal, incluidos preferentemente los seres humanos.

Como se usa la presente memoria descriptiva, "alimento" significa cualquier producto ingerible seguro para uso animal, incluido un uso humano e incluye "alimentos funcionales", "alimentos de diseño" y "alimentos".

50 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "alimento funcional" significa un producto de apariencia similar a los alimentos convencionales y es consumido como parte de una dieta habitual, pero que ha demostrado ventajas

fisiológicas y/o reduce el riesgo de enfermedad más allá de las funciones nutritivas básicas.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "nutracéutico" significa un producto no farmacéutico preparado en la forma de píldoras, polvos, pócimas y otras formas medicinales no generalmente asociadas con los alimentos pero que tienen ventajas fisiológicas o proporcionan una protección contra enfermedades.

- 5 En cualquier lugar del mundo, los nutracéuticos, alimentos funcionales, alimentos de diseño y alicamentos son sinónimos de alimentos e ingredientes alimenticios que se considera que proporcionan ventajas médicas o de salud, incluidos la prevención y el tratamiento de enfermedades.

10 Según la presente invención, se proporciona una composición para su incorporación a alimentos, bebidas, complementos nutritivos o vitamínicos y nutracéuticos, que comprende uno o más fitoesteroles y/o fitoestanoles y glucomanano.

Los elementos de la composición se describirán más en detalle a continuación.

#### Fitoesteroles/fitoestanoles

15 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "fitoesterol" incluye todos los esteroides sin limitación, por ejemplo: sitoesterol, campesterol, estigmasterol, bracicasterol (incluido dihidrobracicasterol), demosterol, calinosterol, poriferasterol, clionasterol, hergosterol, coprosterol, codisterol, isofucosterol, fucosterol, clerosterol, nervisterol, latoesterol, estelasterol, espinasterol, condriasterol, peposterol, avenasterol, isoavenasterol, fecosterol, polinasterol y todas las formas naturales o sintetizadas y su derivados, incluidos los isómeros. El término "fitoestanol" se refiere a esteroides saturados o hidrogenados que incluyen todas las formas naturales o sintetizadas y su derivados e isómeros. Debe entenderse que las modificaciones de los fitoesteroides y fitoestanoles, es decir, que incluyen cadenas laterales, caen también dentro de las previsiones de esta invención. Por ejemplo, las previsiones de esta invención incluyen claramente 24-beta-etilsitoestanol, 24-alfa-etil-22-dihidrositoestanol. Debe entenderse también que, cuando hayan dudas en toda la memoria descriptiva y salvo que se especifique otra cosa, el término "fitoesterol" abarca tanto esterol como estanol. En una forma que es la más preferida, el esterol está en su forma saturada y es un sitoestanol, preferentemente beta-sitoestanol.

25 Estos esteroides y estanoles para ser usados de acuerdo con esta invención, pueden ser suministrados a partir de una diversidad de fuentes naturales. Por ejemplo, pueden ser obtenidos a partir del tratamiento de aceites vegetales (incluidas plantas acuáticas), como aceite de maíz y otros aceites vegetales, aceite de germen de trigo, extracto de arroz, salvado de arroz, aceite de colza, aceite de girasol, aceite de sésamo y aceites de pescado (y otras fuentes marinas). Pueden ser derivados también de hongos, por ejemplo, ergosterol. Consecuentemente, la presente invención no está limitada a una fuente cualquiera de esteroides. La patente de EE.UU. n.º de serie 4.420.427 expone la preparación de esteroides a partir de lodo de aceite vegetal usando disolventes como metanol. Consecuentemente, los fitoesteroides y fitoestanoles pueden ser obtenidos a partir alquitrán de aceite de resina o jabón, subproductos de prácticas forestales como se describe en la patente de EE.UU. n.º de serie 5.770.749, incorporada como referencia a la presente memoria descriptiva.

35 Los fitoesteroides y fitoestanoles, como se usan en la presente memoria descriptiva, pueden estar en sus formas libre o esterificadas, es decir, opcionalmente, el fitoesterol o fitoestanol puede ser esterificado antes de la formación de la composición descrita en la presente memoria descriptiva. La etapa de esterificación hace que los fitoesteroides y/o fitoestanoles sean más solubles en grasas y aceites, que, en algunos casos, pueden facilitar la incorporación de la composición en diversos sistemas de suministro.

40 Para formar ésteres de fitoesterol y/o fitoestanol, son conocidos muchos métodos en la técnica. Por ejemplo, uno o más ácidos alifáticos adecuados o sus ésteres con alcoholes de bajo punto de ebullición pueden ser condensados con el fitoesterol y/o fitoestanol seleccionado. Pueden ser usados una gran diversidad de ácidos alifáticos o sus ésteres e incluyen todos los ácidos alifáticos que consisten en una o más cadenas alquílicas con uno o más grupos carboxilos terminales. Estos ácidos alifáticos pueden ser naturales o sintéticos y están representados por las siguientes fórmulas químicas:

a) R1-COOH (ácido monocarboxílico) en la cual:

R1 es un grupo alquilo saturado sin ramificar, representado por CH<sub>3</sub>-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>- o CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>- en las que n = 3-25; o

50 R1 es un grupo alquilo saturado ramificado representado por C<sub>n</sub>H<sub>2n-2m+1</sub>, en la que n=1-25 es el número de átomos de carbono contenidos en el grupo R1; la ramificación se refiere normalmente, pero sin limitación, a una o más cadenas laterales de grupos metilo (ramificaciones); o

R1 es un grupo alquilo insaturado sin ramificar o ramificado, representado por la fórmula C<sub>n</sub>H<sub>2n-2m+1</sub>, en la que n=1-25 es el número de átomos de carbono en R1 y m = grado de insaturación; o

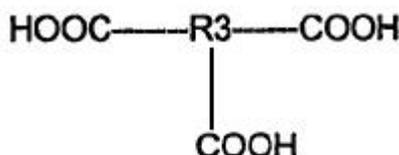
b) HOOC-R2-COOH es un ácido dicarboxílico en el cual:

R2 es un grupo alquilo saturado sin ramificar, representado por -CH2- o -CH2CH2- o -CH2(CH2) $n$ CH2 en que  $n=3-25$ ; o

5 R2 es un grupo alquilo saturado ramificado representado por la fórmula -C $n$ H $2n$ - en la que  $n=1-25$  es el número de átomos de carbono obtenidos en el grupo R2; la ramificación se refiere normalmente, pero sin limitación, a una o más cadenas laterales de grupos metilos (ramificaciones); o

R2 es un grupo alquilo insaturado sin ramificar o ramificado, representado por la fórmula C $n$ H $2n-2m$ , en la cual  $n=1-25$  es el número de átomos de carbono en R2 y  $m$  = grado de insaturación; 0

c) un ácido tricarboxílico representado por la fórmula:



10 en la cual, en esta fórmula:

R3 es un grupo alquilo saturado ramificado representado por -C $n$ H $2n-1$ - en el que  $n=1-25$  es el número de átomos de carbono contenidos en el grupo  $n_3$ ; la ramificación se refiere normalmente, pero sin limitación a una o más cadenas laterales de grupos metilos (ramificaciones); o

15 R3 es un grupo alquilo insaturado ramificado representado por C $n$ H $2n-2m-1$ - en la que  $n=1-25$  es el número de átomos de carbono en R3 y  $m$ = el grado de insaturación; o

d) un ácido mono-, di- o tri-carboxílico como se definió anteriormente, que puede contener 1,2 o 3 grupos hidroxilos en la molécula.

En una forma preferida, el ácido es un ácido alifático o aromático, insaturado o saturado, de cadena lineal o ramificado. Más preferentemente, los ácidos se seleccionan entre otros, entre la siguiente lista: ácido valérico, ácido isovalérico, ácido sórbico, ácido isocaproico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido caproico, ácido ascórbico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido hexacosanoico, ácido octacosanoico, ácido pentadecanoico, ácido erúxico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido palmitoleico y ácido oleico. Los ácidos grasos más preferidos dentro del alcance de la presente invención son ácido linoleico, ácido linolénico y ácido araquidónico que pueden ser obtenidos a partir de fuentes naturales como aceite de cártamo, aceite de girasol, aceite de oliva y aceite de maíz (ácido linoleico), aceite de cártamo, aceite de girasol, aceite de oliva y aceite de jojoba (ácido linolénico y ácido araquidónico) y aceite de semilla de colza (ácido erúxico).

Otros ácidos aromáticos están claramente contemplados dentro del alcance de la presente invención.

30 Una ventaja particular en el uso de ácidos grasos para formar fitoesteroles o fitoestanoles esterificados, es decir, grasas saturadas, de acuerdo con la presente invención, reside en el hecho de que las grasas saturadas aumentan la actividad de lipoproteína lipasa. La actividad de esta última enzima reduce la formación de grasas viscerales.

35 Para formar un éster de fitoesterol de acuerdo con la presente invención, es fitoesterol seleccionado y su ácido o éster con un alcohol volátil puede ser conjuntamente mezclados bajo condiciones de reacción para permitir la condensación de fitoesterol con el ácido para producir un éster. Un método más preferido para preparar estos ésteres que es ampliamente usado en la industria de grasas y aceites comestibles se describe en la patente de EE.UU. nº de serie 5.502.045 (que se incorpora como referencia a la presente memoria descriptiva). Como no se usan sustancias distintas del fitoesterol libre, un éster del ácido libre o sus mezclas y un catalizador de interesterificación como etilato de sodio, la técnica es considerablemente adecuada para preparar productos finalmente para un consumo humano. Globalmente, este método preferido, adaptado para un uso en la presente invención, comprende calentar el (o los fitoesterol (ES) con un éster de ácido graso de aceite vegetal (preferentemente un éster metílico) a una temperatura de 90-120°C y añadir posteriormente un catalizador adecuado como etilato de sodio. El catalizador es seguidamente separado/destruido mediante una cualquiera de las técnicas conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo, añadiendo agua y/o filtración/centrifugación.

45 Otro método que puede ser usado de acuerdo con la presente invención se describe en la patente de EE.UU nº de serie 4.588.717, que se incorpora también como referencia a la presente memoria descriptiva. Un método preferido es mezclar el fitoesterol y el ácido graso conjuntamente, llevando la mezcla a una temperatura de aproximadamente 15°C a aproximadamente 45°C a una presión aproximadamente atmosférica durante aproximadamente una a tres horas.

Consecuentemente, debe entenderse que la definición más amplia posible debe estar de acuerdo con los términos

“fitoesterol” y “fitoestanol” como se usan en la presente memoria descriptiva que incluyen, pero sin limitación: fitoesteroles, y fitoestanoles, fitoesteroles y fitoestanoles esterificados con ácidos alifáticos y aromáticos (formando así ésteres alifáticos o aromáticos, respectivamente), ésteres de ácidos fenólicos, ésteres de cinamatos, ésteres de ferulatos, glicósidos de fitoesterol y fitoestanol y glicósidos o acil-glicósidos acilados.

- 5 En otra realización preferida, el esteroles y/o estanol es incorporado en una micela antes o después de la combinación con el glucomanano. Esta micela puede ser producida usando lecitina o cualquier otro agente emulsionante adecuado y usando técnicas conocidas y ampliamente aplicadas en el estado de la técnica.

#### Glucomanano

- 10 El glucomanano (también denominado, de forma intercambiable, glucomana konjak, fibra de konjak, glucomana de konjak, glucomana de fibra de konjak, glucomana konjak y mañana) es una fibra dietética soluble en agua derivada principalmente de la raíz konjak y la planta konjak perenne (*Amorphophallus konjak* C Koch). La raíz de konjak es una planta perenne única en Asia y es cultivada extensivamente en Japón. El tubérculo de konjak fresco contiene un promedio de 13% de materia seca de la que aproximadamente un 70% es glucomanano (el 30% restante es almidón). Hay otras fuentes de glucomanano, por ejemplo, la planta de Aloe, levadura y fenogreco, sin embargo, aunque estas fuentes pueden ser usadas, la fuente preferida es el tubérculo de konjak.

15 “Konnyaku”, que es preparado a partir del tubérculo de konjak, ha sido usado en la medicina y en alimentos tradicionales japoneses durante cientos de años, cuyo componente principal es glucomanano. El Konnyaku comestible es preparado a partir de harina de konjak, que es suministrada a partir del tubérculo.

- 20 El glucomanano es un polisacárido de peso molecular elevado (200.000-2.000.000 de dáltones) que consiste en unidades repetidas de beta-D-glucosa y beta-D-manosa unidas en enlaces 1,4.

- 25 Tiene un peso molecular que es el más elevado y una viscosidad que es la más considerable de cualquier otra fibra dietética<sup>14</sup>. Como otras fibras dietéticas, el glucomanano es considerado un laxante “formador de volumen” y ha sido usado para tratar el estreñimiento<sup>15</sup>. Se ha mostrado que disminuye los niveles de glucosa en suero en pacientes diabéticos<sup>16</sup> y ayuda a la diabetes relacionada con el embarazo<sup>17</sup>. El glucomanano, tomado como un complemento, se ha mostrado que tiene efectos para rebajar los lípidos y la presión sanguínea<sup>18</sup> y la glicemia<sup>19</sup>.

- 30 Los tubérculos de konjak han sido tradicionalmente apelmazados para producir un polvo para una preparación en forma de macarrones o gelatina para su adición a guisos, salsas y sopas. Son conocidas muchas más técnicas modernas en el estado de la técnica para separar glucomanano de harina de konjak. En una de ellas, la harina de konjak se lleva a ebullición en agua, se trata con solución de Fehling para convertir el glucomanano en su complejo de cobre y posteriormente es descompuesto nuevamente en forma de glucomanano después de una purificación. Este método se describe más en detalle en la publicación J. Agri. Chem Soc. Japan, 6,991-995 (1930). En otra técnica, la harina de konjak es extraída con agua, las impurezas se separan precipitando con etanol y volviendo a disolver el precipitado en agua varias veces y secando el precipitado obtenido para obtener glucomanano puro. Esta técnica se describe en Bull. Chem. Soc. Japan 49, 298-322 (1927). Hay otras diversas y numerosas técnicas conocidas en el estado de la técnica y la preparación de la composición de la presente invención no está limitada a un método particular cualquiera para extraer y purificar glucomanano.

#### Método de uso

- 40 Se describe en la presente memoria descriptiva un método para tratar o prevenir una enfermedad cardiovascular y sus estados derivados que incluyen aterosclerosis, estados hiperlipidémicos, dislipidemia, hipoalfalipoproteinemia, hipertensión, hipercolesterolemia y obesidad visceral en un animal, que comprende administrar una cantidad no tóxica y terapéuticamente eficaz de una composición que comprende uno o más fitoesteroles y/o fitoestanoles y glucomanano.

- 45 Se describe adicionalmente un método para conseguir al menos uno de los siguientes objetivos profilácticos y de tratamiento en un animal: disminuir el colesterol de LDL en suero, aumentar el colesterol de HDL en suero, disminuir los triglicéridos en suero, disminuir la ganancia de peso y aumentar la pérdida de peso y tratar las complicaciones y estados asociados y que pueden ser causas de diabetes de tipo 2, que comprende administrar al animal una cantidad no tóxica y terapéuticamente eficaz de la nueva composición.

- 50 Esta invención comprende adicionalmente cualquiera de las composiciones reivindicadas para estas indicaciones, particularmente, pero no exclusivamente, en la forma de alimentos, bebidas, nutracéuticos, complementos nutricionales y complementos vitamínicos.

En particular, los compuestos de la presente invención se ha encontrado que son especialmente útiles para abordar al menos dos factores significativos que contribuyen a la presentación multi-factorial de una enfermedad cardiovascular: niveles elevados de LDL y niveles elevados de colesterol total.

- 55 Los efectos deseados descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser conseguidos de un cierto número de formas diferentes. Como se indicó anteriormente, las composiciones de la presente invención pueden ser

administradas mediante cualquier medio convencional disponible para ser usado conjuntamente con nutracéuticos, alimentos que incluyen alimentos funcionales, bebidas y similares.

La expresión “terapéuticamente eficaz” está destinada a cualificar la cantidad de la composición tomada o administrada al mamífero, en particular el ser humano, con el fin de conseguir uno o más de los siguientes objetivos profilácticos y/o de tratamiento:

- 5
- a) disminuir el colesterol de LDL en suero;
  - b) aumentar el colesterol de HDL en suero;
  - c) disminuir los niveles de triglicéridos en suero;
  - d) tratar estados asociados con CVD de forma general;
- 10
- e) tratar la aterosclerosis;
  - f) tratar la hipercolesterolemia;
  - g) tratar un estado hiperlipidémico;
  - h) tratar la hipertensión;
  - i) disminuir la síntesis de colesterol;
- 15
- j) disminuir la ganancia de peso;
  - k) aumentar la pérdida de peso;
  - l) prevenir, reducir, eliminar o mejorar un estado o trastorno dislipidémico;
  - m) prevenir, reducir, eliminar o mejorar la hipercolesterolemia o hipoalfalipoproteinemia;
  - n) prevenir, reducir, eliminar o mejorar el desarrollo de lesiones ateroscleróticas;
- 20
- o) prevenir, reducir, eliminar o mejorar cualquier estado, enfermedad o trastorno que tenga como su base o que se exacerbe por una deficiencia de HDL en plasma o exceso de LDL, VLDL, Lp(a), beta-VLDL, IDL o lipoproteínas remanentes;
  - p) tratar la diabetes mellitus y estados asociados con la diabetes mellitus;
  - q) mejorar la tolerancia a la glucosa;
- 25
- r) regular los niveles de glucosa en suero y
  - s) mejorar la sensibilidad a la insulina celular.

Es preferido que al menos 0,8 gramos de fitoesterol/fitoestanol y hasta 13 gramos de glucomanano sean proporcionados a la composición, en una o más formas, para una administración diaria, basada en un ser humano individual de 70 kg. Más preferentemente, se pueden proporcionar entre 1,0 g y 3 gramos de fitoesterol/fitoestanol y de aproximadamente 2-10 gramos de glucomanano a la composición, en una o más formas, para una administración diaria, basada en un ser humano individual de 70 kg.

#### Mecanismo de acción

Aunque no están previstas vinculaciones a ninguna teoría, en cuanto a las diversas eficacias terapéuticas de las composiciones descritas en la presente memoria descriptiva, parece que el efecto beneficioso de la combinación única de esterol/glucomanano, como se describe en la presente memoria descriptiva, se sitúa en los mecanismos complementarios, aunque diferentes, a través de los cuales probablemente funciona cada componente.

Se ha sugerido en la bibliografía que la presencia de hidratos de carbono no digeribles o semi-digeribles en los procedimientos del tracto gastrointestinal posee acciones beneficiosas a la velocidad de liberación y absorción de glucosa a partir de hidratos de carbono digeribles en la corriente sanguínea. El aminoramiento de la velocidad de liberación de hidratos de carbono de la dieta se cree que suprime la velocidad de liberación de insulina a partir del páncreas y ayuda al procedimiento global de homeostasis de glucosa en sangre. La supresión en la sangre de la velocidad de elevación de insulina se cree también que hace decaer la activación de la biosíntesis de colesterol corporal global, ya que se ha demostrado que la insulina potencia la producción corporal de colesterol. Puede haber algún bloqueo adicional de la absorción intestinal de colesterol por glucomanano, como con otras fibras dietéticas.

En comparación, se supone que los fitoesteroles desplazan al colesterol de la fase micelar y reducen así su

absorción o la posibilidad de competir con sitios receptores y/o portadores en el procedimiento de absorción de colesterol.

5 Aunque los esteroides se ha encontrado que son no tóxicos y perfectamente seguros para una ingestión incluso a dosis elevadas, con la excepción de los pacientes que tengan un estado raro denominado fitosterolemia), no se puede decir lo mismo respecto al glucomanano, que puede provocar incomodidad abdominal a dosis elevadas. Se cree que sobre esta base complementaria, los presentes autores han descubierto un emparejamiento entre estos dos elementos que se fundamenta en los diferentes mecanismos de acciones para conseguir el resultado terapéutico deseado, mientras se minimiza al mismo tiempo los efectos secundarios desagradables de la administración masiva de fibras.

#### 10 Métodos de uso

Los efectos deseados descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser conseguidos de un cierto número de formas diferentes. Estos compuestos pueden ser administrados por cualquier medio convencional disponible para ser usado conjuntamente con productos farmacéuticos, nutracéuticos, alimentos, bebidas y similares.

15 La cantidad del compuesto que se requiere para conseguir los efectos deseados, naturalmente dependerá de un cierto número de factores como el compuesto particular escogido, el modo de administración y el estado del paciente.

Los compuestos de la presente invención pueden ser administrados a un paciente por sí mismos o en composiciones en las que estén mezclados con vehículos o excipientes adecuados.

20 Las composiciones de la presente invención pueden ser fabricadas de una manera que sea conocida por sí misma, por ejemplo, por medio de procedimientos de mezclado convencional, disolución, granulación, emulsionamiento, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

En otra forma de la presente invención, las composiciones de la presente invención pueden ser administradas a través de alimentos, bebidas, complementos nutritivos y nutracéuticos que incluyen, sin limitación los siguientes:

25 1) productos lácteos como quesos, mantequilla leche y otras bebidas lácteas, productos para untar y mezclas lácteas, helado y yogurt;

2) productos basados en grasas como margarinas, productos para untar, mayonesa, productos grasos, productos cocinados y aceites y preparaciones para frituras;

3) productos basados en cereales que comprenden granos (por ejemplo pan y pasta) en que estos artículos son cocinados, cocidos o tratados de algún otro modo;

30 4) dulces como chocolate, caramelos, chicle, postres, rellenos no lácteos (por ejemplo, Cool Whip®) sorbetes, helados y otras masas;

5) bebidas, tanto alcohólicas como no alcohólicas y que incluyen colas y otras bebidas refrescantes, bebidas de zumo, complementos dietéticos y bebidas sustitutivas de comidas como las comercializadas bajo las marcas Boost® y Ensure®; y

35 6) productos diversos que incluyen huevos y productos de huevo, alimentos tratados como sopas, salsas de pastas previamente preparadas, comidas previamente formadas y similares.

40 Las composiciones de la presente invención pueden ser incorporadas directamente y sin modificación adicional al alimento, producto nutracéutico o bebida y similares mediante técnicas como mezclado, infusión, inyección, combinación, dispersión, emulsionamiento, inmersión, pulverización y amasado. Alternativamente, los compuestos pueden ser aplicados directamente al alimento o la bebida por el consumidor antes de la ingestión. Estos son modos simples y económicos de suministro.

#### Ejemplos

La presente invención se describe mediante ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1 – Efecto de la composición sobre colesterol y LDL – estudio humano (referencia)

45 Sumario y resultados: El objetivo del presente estudio fue examinar sus efectos sobre perfiles de lípidos en sujetos levemente hipercolesterolémicos con y sin diabetes de tipo 2. Se implicaron trece diabéticos de tipo 2 edad= 56, 31 ± 10, 77 y BMI = 30, 96 ± 3, 37) y diez y seis testigos (edad= 55, 19 ± 6,46 y BMI = 27, 70 ± 4,32) en una prueba cruzada al azar que contenía 4 periodos dietéticos de 21 días cada uno. Cada fase estaba separada por 28 días de un período de refresco.

50 Durante cada uno de los cuatro períodos de tratamiento, los sujetos consumieron 1) esteroides de vegetales 1,8 g/d),

2) glucomanano (10 g/d), 3) una combinación de los dos o 4) un placebo en un orden al azar.

El esteroles de vegetales y el glucomanano fueron proporcionados en una barra de granola. Los sujetos fueron mantenidos en su dieta habitual durante el estudio. La reducción media global de colesterol fue de -7,8% (esteroles de vegetales) -10,4% (glucomanano), -13,1% (combinación) y -2,4% (placebo). Hubo una diferencia significativa entre el tratamiento de combinación y de placebo  $p < 0,05$ ). La reducción media global de los niveles de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de estos estados fue de -9,8% (PA), -14,3%, -21,4% y -2,4%, respectivamente. Los niveles de lactoesterol en plasma y el índice de la síntesis de colesterol fueron disminuidos (-23,3%,  $p < 0,05$ ) después de la administración de la composición de glucomanano/fitoesterol en comparación con el placebo. Los niveles medios globales de campesterol en plasma, un índice de la absorción de colesterol fueron inferiores ( $p < 0,05$ ) en el diabético frente al grupo no diabético.

El tratamiento de combinación disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) los niveles de colesterol de LDL en los grupos tanto diabéticos como testigos. Los resultados muestran claramente que el tratamiento de combinación que usa la composición de la presente invención produce un mayor efecto que los esteroides de vegetales o el glucomanano solos. En combinación, una composición de esteroides de vegetales y glucomanano es muy eficaz para disminuir los niveles de colesterol total y colesterol de LDL en pacientes hipercolesterolémicos con o sin diabetes de tipo 2.

#### Detalles del estudio

Los objetivos fueron ensayados usando una prueba clínica cruzada controlada. Los sujetos consumieron comidas auto-seleccionadas. Los especialistas en dietética dieron instrucciones a los sujetos para que tomaran una dieta nutritivamente adecuada de grasas (30%), hidratos de carbono (55%) y proteínas (15%) durante cada período que fuera necesario para abordar los objetivos establecidos. Las ingestiones de alimentos se valoraron usando los registros de alimentos de 24 horas durante tres días durante cada período. Este experimento implicó someter a ensayo los efectos de cuatro dietas separadas en el metabolismo de lípidos en 15 sujetos sanos pero hipercolesterolémicos, con sobrepeso marginal, con diabetes de tipo 2 y 15 testigos con nivel de lípidos y peso coincidentes, usando un diseño cruzado al azar en el que las ingestas de grasas fueron mantenidas constantes a lo largo de cada una de las dos fases del experimento:

i) testigo

ii) 1,8 g/d de esteroides, proporcionados en margarina

iii) 10 g/d de glucomananos, proporcionados en una barra

iv) 1,8 g/d de esteroides y 10 g/d de glucomananos, proporcionados en una margarina y una barra.

Selección de sujetos: machos sanos y hembras post-menopáusicas, de 40-80 años de edad, fueron seleccionados para la determinación de los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa en circulación en ayunas. Los sujetos aceptados tenían niveles de colesterol de LDL en plasma de 3,4-5 mmol/l, niveles de triglicéridos por debajo de 4 mmol/l y poseían hetero- o homo-figocis para apolipoproteína E3. Los criterios de diagnósticos para la diabetes de tipo 2 incluían un nivel de glucosa en plasma en ayunas de  $\geq 7$  mmol/l y un nivel de glucosa en plasma en una muestra 2 h después de un ensayo de tolerancia a la glucosa oral estandarizado de  $\geq 11,1$  mmol/l (75). Los sujetos diabéticos poseían niveles de HbA<sub>1c</sub> de 6- 9%. Los criterios para sujetos del grupo testigo incluían niveles de glucosa en sangre en ensayos de tolerancia en ayunas y post-glucosa de al menos 20% por debajo de los valores de corte anteriormente mencionados. Los sujetos con diabetes de tipo 2 y testigos se hicieron coincidir en cuanto al género y el índice de masa corporal (BMI) al acceder al estudio dentro de un intervalo de 23 a 30 kg/m<sup>2</sup>.

Protocolo y dietas: los sujetos experimentaron una prueba cruzada al azar que contenía 4 períodos dietéticos de 21 d cada uno separados por un intervalo de refresco de al menos 4 semanas y durante cada período de tiempo, los sujetos consumieron sus dietas regulares sin restricciones. Durante cada período de tratamiento los sujetos consumieron dietas de alimentos sólidos nutritivamente adecuadas siguiendo las instrucciones del especialista dietético. Del 55% de energía proporcionada en forma de hidratos de carbono, los hidratos de carbono complejos constituían al menos un 75%, con alimentos de bajo índice glicémico seleccionados cuando fue posible. Las ingestas dietéticas de los sujetos fueron medidas usando registros de alimentos de 3 días en cada período. Los fitoesteroides (sitoesterol [40%], campesterol [30%], dihidrobrasicasterol [20%] y otros [10%]) mezclados en la margarina fueron proporcionados a los sujetos y se les dio instrucciones para que consumieran la margarina (ii) al nivel que proporcionara fitoesteroides a 1,8 g/día. Los glucomananos fueron proporcionados en aperitivos a un nivel de 10 g/d. La margarina y las barras testigos fueron utilizados en las fases en la que no estaban incluidos los tratamientos. Los sujetos fueron advertidos de que consumieran dietas para mantener un equilibrio de peso individual usando una ecuación predictiva basada en cada peso del sujeto, altura, edad, nivel de actividad y género. Durante el estudio, los pesos corporales fueron comprobados semanalmente para examinar los posibles efectos de la intervención dietética sobre el cambio de peso corporal.

Se recogieron muestras de sangre en el valor de tiempo cero y semanalmente durante el período experimental para una valoración de los niveles de lipoproteínas en plasma de glucosa, insulina, colesterol en total y subfracciones LDL, los niveles de fitoesterol principal fueron también medidos en dietas y plasma usando GLC (40).

Se usó la ecuación de Friedewald para calcular las concentraciones de LDL-C. Los esteroides de vegetales, sitoesterol, campesterol y dihidrobrasicasterol serán cuantificados usando CLC y un patrón interno de 5-alfa-colestanol.

5 Determinación de la absorción de colesterol usando la metodología de relaciones de isótopos duales: Se usó colesterol libre extraído de RBC para determinar el enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$ - y  $\text{D}_7$ -colesterol.

Determinación de la biosíntesis de colesterol: La biosíntesis de colesterol se determinó como la velocidad de incorporación de deuterio a partir de agua corporal en colesterol libre de membrana RBC durante el período entre 72 (día 20 y 96 (día 21) h al final de cada tratamiento. El enriquecimiento en deuterio se midió en colesterol libre de RBC y agua en plasma.

10 Potencia y análisis estadísticos: se calculó el tamaño del grupo ( $n= 15$  por grupo) para proporcionar una probabilidad de 80% de detectar una diferencia anticipada en los parámetros ensayados de 20% usando un coeficiente de variación en el grupo (CV) de 15-20%. La síntesis se midió en un grupo de sujetos levemente hipercolesterolémicos usando la incorporación de deuterio en un experimento previo mostrado a una CVD 18%.

15 Ejemplo 2. Efectos de esteroides de vegetales y glucomanano sobre la absorción de colesterol, biosíntesis y niveles de lípidos en plasma así como control glicémico en sujetos con y sin diabetes de tipo 2

Los pacientes diabéticos de tipo 2 tienen un riesgo tres veces más elevado de desarrollar CVD que los sujetos no diabéticos. La dislipidemia se produce a menudo en diabéticos de tipo 2 y el metabolismo del colesterol está alterado en la diabetes de tipo 2 debido posiblemente a una sensibilidad disminuida a la insulina y un metabolismo perturbado de glucosa. Diversos estudios informan una síntesis mayor de colesterol y unas velocidades inferiores de absorción en diabéticos de tipo 2 en comparación con sujetos no diabéticos. Los esteroides de vegetales reducen los niveles de colesterol en circulación reduciendo la absorción intestinal de colesterol. Sin embargo, esta eficacia en la disminución de colesterol está a menudo parcialmente compensada por un aumento simultáneo en la síntesis de colesterol. Como una fibra soluble, el glucomanano rebaja los niveles de colesterol disminuyendo la velocidad de biosíntesis de colesterol al disminuir la velocidad digestiva y la secreción de insulina postprandial. Considerando el hecho de que los esteroides de vegetales y el glucomanano disminuyen los niveles de colesterol en circulación a través de diferentes mecanismos, es importante valorar el efecto hipocolesterolémico de esta combinación de esteroides de vegetales y glucomanano en sujetos con diabetes de tipo 2 y sin diabetes.

Los objetivos fueron: i) Determinar los niveles de lípidos en circulación, el perfil de esteroides de plantas así como el control glicémico en respuesta a un complemento de 1) esteroides de plantas, 2) glucomanano, 3) una combinación de cada uno de los individuos diabéticos de tipo 2 y no diabéticos.

30 ii) Determinar si el grado de respuesta de los niveles de lípidos en circulación y esteroides de plantas, así como el control glicémico, son diferentes entre los individuos diabéticos de tipo 2 y no diabéticos.

#### Diseño y métodos experimentales

35 Se reclutaron dieciséis voluntarios no diabéticos (7 machos y 9 hembras) y trece diabéticos de tipo 2 (4 machos y 9 hembras) con hipercolesterolemia leve a través de periódicos locales. Los sujetos tenían edades entre 38 y 74 años. Los sujetos hembras eran post-menopáusicas. Se pidió a los sujetos que proporcionan un historial médico y completaran un examen físico antes de ser aceptados en el estudio. Se recogieron muestras de sangre en ayunas y orina y fueron enviadas a los laboratorios LDS Diagnostic Laboratories (Pointe Claire, QC, Canadá) para análisis bioquímicos, hematológicos y de orina. Se seleccionaron sujetos con niveles de colesterol de LDL en suero entre 2,75 y 6,9 mmol/l y niveles de triglicéridos por debajo de 4 mmol/l para el estudio. Para sujetos diabéticos de tipo 2 eran necesarios niveles de glucosa en sangre en ayunas  $\geq 7$  mmol/l y niveles de HbA1c entre 6 y 9%. Para sujetos no diabéticos, los criterios de los niveles de glucosa en sangre en ayunas fueron menos de 6,1 mmol/l. Los sujetos que tenían una terapia hipolipidémica o de insulina, enfermedades crónicas como enfermedad gastrointestinal, renal, pulmonar, hepática o biliar y un historial de angina, fallo cardíaco cognitivo, uso crónico de laxantes fueron excluidos del estudio. Se permitió que los sujetos continuaran su medicación de metformina, sulfonilurea, hormona tiroidea, agentes antihipertensores y estrógenos post-menopáusicos durante el estudio completo.

#### Diseño y protocolo experimental

El estudio fue una prueba clínica cruzada al azar que implicaba cuatro fases de tratamientos de 21 días cada una separadas por un período de refresco de 4 semanas entre fases. A los sujetos se les asignaron 4 tratamientos diferentes en total en un orden al azar y consumieron 1,8 g/día de esteroides de vegetales, 10 g/día de glucomanano, una combinación de ambos o ninguno como testigo. La mezcla de esteroides de vegetales contenía 67,3% de sitoesterol, 10,8% de sitoestanol, 8,2% de campesterol, 1,6% de campestanol y 12,1% de otros. Los esteroides de vegetales y el glucomanano fueron proporcionados en la forma de barras de granola (Forbes Medi-tech Inc. Vancouver, BC, Canada). Las composiciones nutritivas de las barras de granola se presentan en la Tabla 1. A los sujetos se les dieron instrucciones de que tomaran una barra entre comidas como aperitivo, tres veces al día junto con 250 ml de bebida. Las barras fueron proporcionadas a los sujetos cada semana (día 0, 8 y 15) en la entidad Mary Emily Clinical Nutrition Research Unit of McGill University (Montreal, QC, Canada). El cumplimiento fue

5 valorado pesando la cantidad de barras de granola devueltas cada semana. Se realizaron exámenes físicos al comienzo (día 0) y al final (día 21) de cada fase mediante el facultativo del estudio para asegurar el estado de salud de todos los participantes. Durante el estudio se pidió a los sujetos que mantuvieran su hábito dietético. El peso corporal se midió semanalmente (día 0, 8, 15 y 21). Los efectos secundarios de los cambios dietéticos durante el período de estudio se verificaron mediante un cuestionario al comienzo (día 0) y al final (día 21) de cada fase de tratamiento.

10 Las muestras de sangre en ayunas se tomaron en el día 0, día 8, 15 y 21, durante cada fase. El plasma y los glóbulos rojos se separaron por centrifugación durante 15 minutos a 1.500 rpm durante 30 minutos la extracción de sangre y se almacenaron a -20°C hasta el análisis. Los niveles de esteroides de vegetales, insulina y fructosamina fueron medidos al comienzo (día 0) y al final de cada fase (día 21). En el último día de cada fase (día 21) y después de la recogida de muestras de sangre en ayunas, se realizó un ensayo de tolerancia a la glucosa oral de 2 horas. Se proporcionó un líquido que contenía 50 g de glucosa por vía oral a cada sujeto y se tomaron muestras de sangre mediante pinchazo en un dedo cada media hora durante 2 horas. La apetitosidad de las barras de granola del tratamiento se evaluó mediante un cuestionario al final de cada fase de tratamiento.

15 Determinación de las concentraciones de lípidos en sangre

El colesterol total en plasma, colesterol de LDL, colesterol de HDL y concentraciones de triglicéridos se determinaron por vía enzimática usando un analizador de química Hitachi/991 (Roche Diagnostic Inc. Indiana IN) en el hospital Lachine (Montreal, QC, Canada). Los niveles de colesterol de LDL en plasma se calcularon usando la ecuación de Friedewald.

20 Determinación de las concentraciones de esteroides de vegetales en plasma

25 Las concentraciones de esteroides de vegetales en plasma se dividieron por duplicado mediante cromatografía gas-líquido como se usa comúnmente en este campo. Brevemente, se saponificó 1,0 ml de plasma con KOH metanólico a 100°C durante 2 h. Los lípidos no saponificados fueron extraídos con éter de petróleo. Se añadió un patrón interno de 5- $\alpha$ -colestano al comienzo de la extracción de lípidos. Los extractos lípidos fueron analizados mediante una cromatografía gas-líquido equipada con un detector de ionización de llama (HP 5890 series II; Hewlett Packard, Palo Alto CA) usando una columna de capilaridad con un diámetro interno de 0,25 mm (SAC-5; Supelco, Bellefonte PA). Las temperaturas del detector y el inyector se ajustaron a 310 y 300°C, respectivamente. Las muestras se realizaron isotérmicamente a 285°C. SE identificaron picos de esteroides de vegetales mediante comparación con patrones autenticados (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville ON, Canada).

30 La determinación de la insulina en plasma, fructosamina en suero y concentraciones de glucosa en sangre y concentraciones de insulina en plasma se hicieron por duplicado, usando estuches de radioinmunoensayos disponibles en el comercio (ICN Pharmaceutical, Inc., Costa Mesa, CA) utilizando <sup>125</sup>I como trazador. La radioactividad se determinó mediante un contador gamma (LKB Wallac, 1282 compugamma CS, Fisher Scientific, Montreal, QC, Canada) y se expresó como recuentos por minuto (CPM). Las concentraciones de insulina en plasma se cuantificaron en referencia a una curva estándar. Las concentraciones de fructosamina en suero se determinaron mediante los laboratorios LDS Diagnostic Laboratories (Pointe Claire, QC, Canada). Los niveles de glucosa en sangre se midieron usando un glucómetro portátil, Glucometer Elite XL (Bayer Inc., Toronto, ON, Canada).

#### Resultados

40 Un total de 16 individuos diabéticos de tipo 2 y 18 no diabéticos participaron en el estudio, de los que 13 y 16 completaron satisfactoriamente todos los tratamientos, respectivamente. Dos sujetos (uno no diabético y uno sujeto diabético de tipo 2) retiraron su participación después del complemento de glucomanano, debido a molestias gástricas. Los resultados de 3 sujetos (1 no diabético y 2 sujetos diabéticos de tipo 2) fueron excluidos del análisis estadístico debido a su bajo cumplimiento (menos de 50%). Las características de línea de base de los sujetos se presentan en la Tabla 2.

45 El índice de masa corporal, triglicéridos en plasma y todos los indicadores diabéticos que incluyen glucosa, insulina, HbA1c y fructosamina fueron superiores ( $p < 0,05$ ) en el grupo diabético de tipo 2 que en el grupo no diabético. Sin embargo, los niveles de colesterol de LDL en plasma fueron inferiores ( $p < 0,01$ ) en los sujetos diabéticos en comparación con los individuos no diabético.

50 El consumo de barras de granola del ensayo fue de 98,8%, 99,4%, 98,4% y 98,8% en el testigo, esteroides de vegetales, glucomanano y tratamiento de combinación, respectivamente (Tabla 3). No hubo diferencia entre los dos grupos de sujetos o entre tratamientos dietéticos en el consumo de barras de granola.

#### Apetitosidad de las barras de granola de tratamiento

55 La apetitosidad de las barras de granola del tratamiento se evaluó de 0 a 10. La puntuación superior mostró la mayor apetitosidad. Como se muestra en la Tabla 4, la apetitosidad de la barra de granola fue de  $7,16 \pm 0,39$ ,  $7,63 \pm 0,38$ ,  $6,36 \pm 0,48$  y  $6,04 \pm 0,36$  en los tratamientos testigo de esteroides de vegetales, de glucomanano y de combinación, respectivamente. Las barras de granola que contenían esteroides de vegetales mostraron una apetitosidad superior

( $p < 0,05$ ) que las barras que contenían glucomanano o las barras que contenían glucomanano y esteroides de vegetales. Los diabéticos de tipo 2 mostraron una mayor aceptación para las barras de granola ensayadas que los no diabéticos.

#### Efectos de tratamientos dietéticos sobre el peso corporal

- 5 Los cambios de peso corporal medio de línea de base fueron  $-0,22 \pm 0,32$ ,  $-0,10 \pm 0,18$ ,  $-0,05 \pm 0,18$  y  $-0,70 \pm 0,24$  kg en los tratamientos testigo, de esteroides de vegetales, de glucomanano y de combinación, respectivamente (Tabla 5). Durante el tratamiento de combinación, los diabéticos de tipo 2 disminuyeron ( $p < 0,05$ ) su peso corporal ( $-1,34 \pm 0,24$  kg), mientras que los no diabéticos mantuvieron su peso corporal ( $-0,29 \pm 0,33$  kg). En otros períodos de tratamiento, no se observaron cambios significativos en el peso corporal en comparación con las líneas de base y entre los dos grupos de sujetos (tabla 5). No se informaron cambios dietéticos significativos durante el período de estudio completo.

#### Efectos de tratamientos dietéticos sobre los lípidos en plasma.

- 15 Los niveles de lípidos en plasma de grupos no diabéticos y diabéticos de tipo 2 durante los períodos de tratamiento se muestran en la Tabla 6. El complemento de glucomanano combinado con esteroides de vegetales redujo ( $p < 0,05$ ) los niveles de colesterol total en plasma ( $4,77 \pm 0,20$  mmol/l) en comparación con el testigo ( $5,38 \pm 0,18$  mmol/l). El cambio porcentual de niveles de colesterol total a partir de la línea de base fue inferior ( $p < 0,05$ ) en los tratamientos de glucomanano ( $-12,40 \pm 2,32\%$ ) y de combinación ( $-14,80 \pm 3,86\%$ ) en comparación con el testigo ( $-3,20 \pm 1,49\%$ ). No hubo diferencia entre grupos de sujetos en respuesta a los tratamientos. Los cambios semanales de los niveles de colesterol total en plasma se muestran en la figura 1. Después de 1 semana, los niveles de colesterol total en plasma fueron disminuidos ( $p < 0,05$ ) en los tratamientos de esteroides de plantas, glucomanano y de combinación en comparación con el testigo. Aunque el grado de reducción de colesterol total estaba gradualmente disminuido después de 2 semanas de tratamientos de esteroides de plantas y glucomanano, La disminución de las concentraciones de colesterol total se observaba todavía con el tratamiento de combinación.

- 25 En el día 0, los niveles de colesterol de LDL en plasma eran inferiores ( $p < 0,05$ ) en el grupo diabético de tipo 2 ( $4,06 \pm 0,20$  mmol/l) en comparación con el grupo no diabético ( $3,47 \pm 0,17$  mmol/l). Después de 21 días de complemento, los niveles de colesterol de LDL de glucomanano ( $3,18 \pm 0,14$  mmol/l) y la combinación de glucomanano y esteroides de vegetales ( $3,00 \pm 0,6$  mmol/l) disminuyeron ( $p < 0,05$ ) en comparación con el testigo ( $3,53 \pm 0,16$  mmol/l). Los niveles de colesterol de LDL en plasma fueron también inferiores ( $p < 0,05$ ) después del tratamiento de combinación ( $3,00 \pm 0,16$  mmol/l) en comparación con el tratamiento de esteroles de vegetales ( $3,43 \pm 0,13$  mmol/l). Los cambios semanales de los niveles de colesterol de LDL durante el estudio se muestran en la figura 2. El colesterol de LDL estaba reducido ( $p < 0,05$ ) después de 2 semanas del tratamiento de combinación. El cambio porcentual de niveles de colesterol de LDL desde el día 1 hasta el día 21 se redujo ( $p < 0,05$ ) por el tratamiento de combinación ( $-21,27 \pm 3,76\%$ ) con relación al testigo ( $-4,51 \pm 3,02\%$ ). NO hubo diferencia entre dos grupos de sujetos en los cambios de niveles de colesterol de LDL después de cada tratamiento dietético.

- 35 Los niveles de colesterol de HDL en plasma no difirieron a lo largo del período de tratamiento. Tampoco hubo diferencia en los cambios de niveles de HDL entre dos grupos de sujetos. La relación de colesterol de LDL en plasma respecto a colesterol de HDL era inferior ( $p < 0,05$ ) después de los tratamientos de vegetales ( $3,41 \pm 0,19$ ) y glucomanano ( $3,27 \pm 0,17$ ) en comparación con el testigo ( $3,68 \pm 0,19$ ). Además, la relación de colesterol de LDL en plasma respecto a colesterol de HDL en el tratamiento de combinación ( $3,11 \pm 0,17$ ) era inferior ( $p < 0,05$ ) que los tratamientos testigo ( $3,68 \pm 0,19$ ) y de esteroles de vegetales ( $3,41 \pm 0,19$ ). No se observaron diferencias entre los dos grupos en la relación de colesterol de LDL respecto a colesterol de HDL.

- 45 La relación de colesterol total respecto a colesterol de HDL era inferior ( $p < 0,05$ ) después de 21 días del tratamiento de combinación ( $5,03 \pm 0,22$ ) que el testigo ( $5,65 \pm 0,25$ ) y los tratamientos de esteroides de vegetales ( $5,36 \pm 0,28$ ). La relación de colesterol total respecto a colesterol de HDL era inferior ( $p < 0,05$ ) en sujetos que tomaron glucomanano ( $5,20 \pm 0,24$ ) en comparación con el tratamiento testigo ( $5,65 \pm 0,25$ ).

Los niveles de triglicéridos no estuvieron afectados por los tratamientos dietéticos. Sin embargo, los niveles de triglicéridos en plasma eran congruentemente superiores ( $p < 0,05$ ) en el grupo diabético que en el grupo no diabético durante el período de estudio completo.

#### Efectos de tratamientos dietéticos sobre esteroides de vegetales en plasma

- 50 Los esteroides de vegetales en plasma en grupos diabéticos de tipo 2 y no diabético se resumen en la Tabla 7. La media global de niveles de campesterol en plasma era inferior ( $p < 0,05$ ) en el grupo diabético ( $5,77 \pm 0,42$   $\mu\text{mol/l}$ ) que en el grupo no diabético ( $7,59 \pm 0,38$   $\mu\text{mol/l}$ ). No hubo diferencia entre los tratamientos.

- 55 No hubo diferencia en los niveles de latoesterol en plasma entre dos grupos en respuesta a los tratamientos. Sin embargo, las reducciones después de 21 días eran mayores ( $p < 0,05$ ) con el tratamiento de combinación ( $-1,25 \pm 0,36$   $\mu\text{mol/l}$ ) en comparación con el tratamiento de esteroides de vegetales ( $0,17 \pm 0,40$   $\mu\text{mol/l}$ ). En el día 21, los niveles de  $\beta$ -sitosterol y la relación de  $\beta$ -sitosterol respecto a colesterol total fueron superiores ( $p < 0,05$ ) en el tratamiento de esteroides de plantas ( $5,50 \pm 0,76$   $\mu\text{mol/l}$  y  $1,11 \pm 0,18$   $\mu\text{mol/mol}$ ) en comparación con el tratamiento de

glucomanano ( $3,81 \pm 0,45 \mu\text{mol/l}$  y  $0,75 \pm 0,45 \mu\text{mol/mol}$ ). Aunque no era significativo, los niveles de  $\beta$ -sitosterol y la relación de  $\beta$ -sitosterol respecto a colesterol total en el tratamiento de combinación, ( $4,72 \pm 0,51 \mu\text{mol/l}$  y  $1,03 \pm 0,12 \mu\text{mol/mol}$ ) eran superiores que el testigo ( $4,53 \pm 0,47 \mu\text{mol/l}$  y  $0,88 \pm 0,10 \mu\text{mol/mol}$ ) y los tratamientos de glucomanano. Los niveles de  $\beta$ -sitosterol en plasma no eran diferentes entre los grupos de diabéticos de tipo 2 no diabéticos después de cada tratamiento.

Efectos de tratamientos dietéticos sobre insulina, fructosamina y ensayo de tolerancia a la glucosa oral de 2 h

Los niveles de insulina en plasma eran superiores ( $p < 0,01$ ) en el grupo diabético ( $39,16 \pm 2,24 \mu\text{IU/ml}$ ) que en el grupo no diabético ( $21,01 \pm 1,00 \mu\text{IU/ml}$ ) (Tabla 8). La relación de niveles de insulina en plasma en relación al tratamiento testigo fue inferior ( $p < 0,05$ ) en los tratamientos de glucomanano ( $-79,7 \pm 25,08\%$ ) que en los de esteroides de vegetales ( $1,71 \pm 6,16\%$ ) y de combinación ( $-5,64 \pm 4,81\%$ ). Los niveles de fructosamina en suero fueron superiores ( $p < 0,01$ ) en sujetos diabéticos ( $3,95 \pm 0,07 \mu\text{mol/g}$ ) que en no diabéticos ( $3,40 \pm 0,03 \mu\text{mol/g}$ ) (Tabla 9). Sin embargo, los tratamientos dietéticos no afectaron a las concentraciones de fructosamina en suero.

Los niveles de glucosa en sangre fueron superiores en diabéticos de tipo 2 que en no diabéticos durante el ensayo de glucosa oral de 2 horas de 50 g (Figura 3). Los tratamientos dietéticos no afectaron a la tolerancia a la glucosa.

Explicación

El descubrimiento principal del presente estudio es que la combinación de esteroides de vegetales y glucomanano tenía un efecto superior de disminución del colesterol que los esteroides de vegetales y glucomanano solos en individuos diabéticos de tipo 2 e hipercolesterolémicos leves no diabéticos. El presente estudio mostró una disminución de los niveles de colesterol de LDL en plasma en 10,6%, 14,15% y 21,3% en tratamientos de esteroides de vegetales, glucomanano y de combinación, respectivamente. Estos resultados indican que los esteroides de vegetales y el glucomanano tienen al menos un efecto aditivo en la disminución de la concentración de colesterol.

Los esteroides de vegetales reducen la incorporación de colesterol en forma de micelas y, por tanto, suprimen la absorción de colesterol dietético y biliar en el intestino. Por otra parte, el glucomanano suprime el pico de insulina postprandial retrasando la absorción de nutrientes en el intestino delgado. Las concentraciones reducidas de insulina postprandial disminuyen la biosíntesis de colesterol posiblemente aumentando la actividad de HMG-CoA. Por tanto, dan lugar a unos mayores efectos hipocolesterolémicos de la combinación de esteroides de vegetales y glucomanano en comparación con esteroides de vegetales y glucomanano solos.

En el presente estudio, el nivel de latoesterol en plasma ( $0,17 \pm 0,40 \mu\text{mol/l}$ ) fue aumentado a partir de la línea de base con el tratamiento de esteroides de vegetales, sin embargo disminuyó después del consumo del tratamiento de combinación de esteroides de vegetales y glucomanano ( $-1,25 \pm 0,36 \mu\text{mol/l}$ ), sugiriendo que el glucomanano suprimió el aumento de la síntesis de colesterol provocada por los esteroides de vegetales. SE ha observado que existe un metabolismo de colesterol alterado en individuos diabéticos de tipo 2. En comparación con sujetos no diabéticos, los diabéticos de tipo 2 tienen una síntesis de colesterol hepático superior y una absorción intestinal inferior. Los niveles de esteroides de vegetales en suero son indicadores de la velocidad de absorción de colesterol cuando los sujetos están tomando dietas sin esteroides de vegetales o tienen una cantidad aproximadamente igual de esteroides de vegetales. De hecho, se ha informado que las concentraciones de esteroides de vegetales en suero son inferiores en diabéticos de tipo 2 que en no diabéticos, apoyando el hecho de que la absorción de colesterol está disminuida en esta población. Los niveles de campesterol en plasma en el grupo diabético ( $5,77 \pm 0,42 \mu\text{mol/l}$ ) eran inferiores ( $p < 0,05$ ) que en el grupo no diabético ( $7,60 \pm 0,38 \mu\text{mol/l}$ ), lo que apoya las observaciones previas. SE supone que la sensibilidad inferior a la insulina en individuos diabéticos está relacionada con la alteración del metabolismo de colesterol. En el presente estudio, se observaron niveles inferiores de campesterol en plasma ( $p < 0,05$ ) en sujetos diabéticos ( $5,77 \pm 0,42 \mu\text{mol/l}$ ), en comparación con sujetos no diabéticos ( $7,59 \pm 0,38 \mu\text{mol/l}$ ), indicando que la homeostasis de colesterol estaba alterada de hecho en estos sujetos.

En el presente estudio, el complemento dietético de glucomanano no mejoró los índices glicémicos como los niveles de insulina en ayunas y fructosamina. Sin embargo, los efectos hipoglicémicos del glucomanano han sido demostrados en estudios previos en individuos sanos y diabéticos de tipo 2. Hopman *et al.* (1988) informaron que el complemento dietético de 2,6 g y 5,2 g de glucomanano disminuyó la elevación postprandial en la insulina en plasma en pacientes con cirugía gástrica previa. Estos resultados fueron apoyados por Scalfi *et al.* (1987) que encontraron resultados similares a una dosis de 6 g/día de glucomanano. Después de 30 días y 65 días de complemento con glucomanano, los niveles de glucosa en sangre en ayunas y los niveles de glucosa en sangre postprandiales de 2 h se redujeron significativamente (Huang, 1990). La discrepancia entre el presente estudio y los previos puede ser debida a la ausencia de control dietético.

En resumen, los resultados del presente estudio muestran que tanto los esteroides de vegetales como el glucomanano rebajan los niveles de colesterol en circulación, sin embargo, la combinación de vegetales y glucomanano tenía un efecto aditivo o mayor e indujo una mayor reducción en los niveles de colesterol total y LDL que los esteroides de vegetales y glucomanano solos. Contrariamente a lo que se esperaba no se observaron cambios en el control glicémico mediante complementos de tratamientos de esteroides de vegetales y/o glucomanano. Los niveles de latoesterol en plasma fueron aumentados después de la ingestión de esteroides de

vegetales, sin embargo, añadiendo glucomanano a los esteroides de vegetales, estos cambios se invirtieron. Por tanto, la combinación de esteroides de vegetales y glucomanano puede ser considerada que existe como una alternativa a las aproximaciones farmacológicas para rebajar los niveles de colesterol de LDL en individuos diabéticos de tipo 2 y hipercolesterolémicos no diabéticos.

5

Tabla 1. Composición nutritiva de barras de granola

Nutrientes (por servicio)	Testigo	Esteroides de vegetales	Glucomanano	Combinación
Energía total (kcal)	120,9	129,3	109,1	118,4
Hidratos de carbono (g)	20,2	19,8	17,7	17,1
Proteínas (g)	2,5	2,4	1,9	2,0
Grasas (g)	3,4	4,5	3,4	4,7
Grasas saturadas (g)	0,6	0,4	0,7	0,4
Sodio (mg)	93,5	63,4	83,3	52,8
Fibra (g)	1,5	1,5	4,5	4,5
Vitamina A (IU)	258,4	145,9	232,9	121,0
Vitamina C (mg)	1,6	1,6	1,2	1,3
Fe (mg)	0,8	0,8	0,7	0,7
Calcio (mg)	14,6	13,4	12,9	11,7

Tabla 2. Características de línea de base de sujetos<sup>1</sup>

Variables	No diabéticos (n= 16)	Diabéticos tipo 2 (n= 13)
Macho/hembra	7/9	4/9
Edades (años)	55,19 ± 1,67	56,81 ± 3,11
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	27,7 ± 1.12	30,96 ± 0,97*
Lípidos (mmol/l)		
Colesterol total	6,05 ± 0,21	5,53 ± 0,21
Colesterol de LDL <sup>2</sup>	4.29 ± 0.19	3,53 ± 0,17**
Colesterol de HDL <sup>3</sup>	1,11 ± 0,09	0,92 ± 0,05
Triglicéridos	1,43 ± 0,13	2,69 ± 0,44**
Glucosa (mmol/l)	5,11 ± 0,12	8,56 ± 0,40***
Insulina (µIU/ml)	21,03 ± 2,04	35.96 ± 4.49**
HbA1c	0,06 ± 0,001	0,07 ± 0,003***
Fructosamina (µmol/g)	3,41 ± 0,08	4,09 ± 0,16***

<sup>1</sup>Los valores se expresan como media ± SE. \*P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001, diferencia significativa del grupo diabético

<sup>2</sup>Colesterol de lipoproteínas de baja densidad

<sup>3</sup>Colesterol de lipoproteínas de densidad elevada

Tabla 3. Consumo medio de barras de granola<sup>1</sup>

Consumo (%)	Testigo	Esteroles vegetales	de Glucomanano	Combinación
No diabéticos	98,8 ± 0,006	99,4 ± 0,003	98,5 ± 0,008	99,0 ± 0,008
Diabéticos de tipo 2	97,6 ± 0,008	98,9 ± 0,006	98,4 ± 0,009	98,5 ± 0,013
Total	98,3 ± 0,005	99,2 ± 0,003	98,4 ± 0,006	98,8 ± 0,007

<sup>1</sup>Los valores se expresan como medias ± SE. El cambio porcentual está basado en datos individuales. El cambio porcentual con relación al testigo está basado en la media del día 21.

Tabla 4. Apetitosidad de barras de granola<sup>1</sup>

Apetitosidad	Testigo	Esteroles vegetales	de Glucomanano	Combinación
No diabéticos	6,31 ± 0,49	7,00 ± 0,51	5,69 ± 0,61	6,06 ± 0,37
Diabéticos de tipo 2	8,29 ± 0,49**	8,46 ± 0,51	7,25 ± 0,70	6,00 ± 0,71
Total	7,16 ± 0,39 <sup>ab</sup>	7,63 ± 0,38 <sup>a</sup>	6,36 ± 0,48 <sup>b</sup>	6,04 ± 0,36 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Los valores se expresan como medias ± SE. Los valores que portan letras de subíndices diferentes indican una diferencia significativa entre los tratamientos (p < 0,05).

\*\* p < 0,01; diferencia significativa del grupo no diabético.

Tabla 5. Cambio de peso corporal en el día 0 y el día 21 de cada período de tratamiento<sup>1</sup>

Peso corporal (kg)	Testigo	Esteroles vegetales	de Glucomanano	Combinación
<b>No diabéticos</b>				
Día 0	75,28 ± 3,92	75,02 ± 3,64	74,29 ± 3,64	75,02 ± 3,81
Día 21	75,00 ± 3,66	75,15 ± 3,66	74,34 ± 3,59	74,73 ± 3,82
Diferencia <sup>2</sup>	-0,28 ± 0,44	0,13 ± 0,20	0,50 ± 0,26	-0,29 ± 0,33
% Cambio	-0,17 ± 0,50	0,17 ± 0,28	0,13 ± 0,33	-0,41 ± 0,39
<b>Diabéticos de tipo 2</b>				
Día 0	80,81 ± 3,05	81,12 ± 2,96	81,54 ± 2,89	81,76 ± 3,00
Día 21	81,69 ± 2,92	81,64 ± 2,77	82,11 ± 2,81	81,68 ± 2,87
Diferencia <sup>2</sup>	-0,13 ± 0,46	-0,46 ± 0,30	-0,21 ± 0,24	-1,34 ± 0,24*
% de cambio	-0,14 ± 0,55	-0,48 ± 0,35	-0,26 ± 0,27	-1,61 ± 0,27*
<b>Total</b>				
Día 0	77,53 ± 2,65	77,50 ± 2,50	77,24 ± 2,51	77,76 ± 2,61
Día 21	77,72 ± 2,51	77,79 ± 2,48	77,51 ± 2,49	77,56 ± 2,59
Diferencia <sup>2</sup>	-0,22 ± 0,32	-0,10 ± 0,18	-0,05 ± 0,18	-0,70 ± 0,24
% de cambio	-0,16 ± 0,36	-0,08 ± 0,22	-0,02 ± 0,23	-0,87 ± 0,28

<sup>1</sup>Los valores están expresados como medias ± SE. El cambio porcentual está basado en datos individuales. El cambio porcentual con relación al testigo está basado en la media del día 21.

\*p < 0,05; diferencia significativa del grupo no diabético

<sup>2</sup>Diferencia entre día 1 y día 21

Tabla 6. Niveles de lípidos en el día 0 y el día 21 de cada período de tratamiento <sup>1</sup>

Lípido (mmol/l)	Testigo	Esteroles de plantas	Glucomanano	Combinación
<b>Colesterol total</b>				
<b>No diabéticos</b>				
Día 0	5,88 ± 0,21	5,90 ± 0,21	5,86 ± 0,23	5,81 ± 0,29
Día 21	5,52 ± 0,28	5,46 ± 0,19	5,07 ± 0,27	4,77 ± 0,35
% de cambio	-1,82 ± 1,95	-7,31 ± 1,75	-13,92 ± 3,23	-16,79 ± 6,67
% con relación a C <sup>2</sup>		-4,36 ± 1,84	-12,57 ± 2,85	-18,23 ± 5,10
<b>Diabéticos de tipo 2</b>				
Día 0	5,61 ± 0,18	5,54 ± 0,19	5,42 ± 0,19	5,49 ± 0,20
Día 21	5,21 ± 0,20	5,06 ± 0,23	4,84 ± 0,16	4,77 ± 0,15
% de cambio	-4,93 ± 2,30	8,41 ± 2,12	-10,50 ± 3,38	-12,3 ± 2,76
% con relación a C <sup>2</sup>		-2,21 ± 3,96	-5,95 ± 4,11	-7,71 ± 2,81
<b>Total</b>				
Día 0	5,76 ± 0,14	5,74 ± 0,14	5,66 ± 0,16	5,67 ± 0,18
Día 21	5,38 ± 0,18 <sup>a</sup>	5,28 ± 0,15 <sup>ab</sup>	4,97 ± 0,16 <sup>ab</sup>	4,77 ± 0,20 <sup>b</sup>
% de cambio	-3,20 ± 1,49 <sup>a</sup>	7,80 ± 1,33 <sup>ab</sup>	-12,40 ± 2,32 <sup>b</sup>	-14,80 ± 3,86 <sup>b</sup>
% con relación a C <sup>2</sup>		-3,36 ± 2,05	-9,50 ± 2,48 <sup>ab</sup>	-13,35 ± 3,14 <sup>b</sup>
<b>Colesterol de LDL<sup>3</sup></b>				
<b>No diabéticos</b>				
Día 0	4,08 ± 0,20	4,10 ± 0,21	4,06 ± 0,20	4,05 ± 0,24
Día 21	3,77 ± 0,24	3,66 ± 0,15	3,42 ± 0,23	3,11 ± 0,26
% de cambio	-3,07 ± 3,31	-10,67 ± 2,14	-15,78 ± 4,04	-26,38 ± 6,00
% con relación a C <sup>2</sup>		-5,42 ± 2,28	-14,33 ± 3,44	-22,73 ± 5,42
<b>Diabéticos tipo 2</b>				
Día 0	3,61 ± 0,22	3,60 ± 0,15	3,47 ± 0,17	3,51 ± 0,18
Día 21	3,53 ± 0,16 <sup>a</sup>	3,43 ± 0,13 <sup>ab</sup>	3,18 ± 0,14 <sup>bc</sup>	3,00 ± 0,16 <sup>c</sup>
% de cambio	-4,51 ± 3,02 <sup>a</sup>	-10,57 ± 2,16 <sup>ab</sup>	-14,47 ± 2,83 <sup>ab</sup>	-21,27 ± 3,76 <sup>b</sup>
% con relación a C <sup>2</sup>		-3,56 ± 2,82 <sup>a</sup>	-11,59 ± 3,19 <sup>b</sup>	-18,14 ± 3,45 <sup>b</sup>
<b>Triglicéridos</b>				
<b>No diabéticos</b>				
Día 0	1,42 ± 0,15	1,42 ± 0,14	1,35 ± 0,13	1,29 ± 0,12
Día 21	1,41 ± 0,16	1,40 ± 0,15	1,19 ± 0,15	1,29 ± 0,19
% de cambio	-1,80 ± 6,91	5,44 ± 8,77	-14,28 ± 6,37	-6,47 ± 6,65
% con relación a C <sup>2</sup>		5,57 ± 8,64	-11,01 ± 8,47	-5,32 ± 11,94
<b>Diabéticos tipo 2</b>				
Día 0	2,32 ± 0,29**	2,16 ± 0,23**	2,03 ± 0,19**	2,20 ± 0,19***
Día 21	2,22 ± 0,24**	2,00 ± 0,23*	2,15 ± 0,25**	2,18 ± 0,22**
% de cambio	0,95 ± 13,14	-10,54 ± 7,63	-0,25 ± 10,23	-3,22 ± 7,47
% con relación a C <sup>2</sup>		-3,00 ± 10,56	5,07 ± 11,41	6,55 ± 10,27
<b>Total</b>				

ES 2 398 847 T3

Lípido (mmol/l)	Testigo	Esteroles de plantas	Glucomanano	Combinación
Día 0	1,82 ± 0,17	1,75 ± 0,14	1,65 ± 0,13	1,70 ± 0,14
Día 21	1,78 ± 0,16	1,68 ± 0,14	1,63 ± 0,17	1,71 ± 0,16
% de cambio	-0,48 ± 7,13	-2,26 ± 5,94	-7,53 ± 5,97	-4,90 ± 4,90
% con relación a C <sup>2</sup>		1,64 ± 6,66	-3,55 ± 7,01	0,19 ± 7,91
Colesterol de HDL <sup>4</sup>				
No diabéticos				
Día 0	1,11 ± 0,09	1,13 ± 0,09	1,07 ± 0,08	1,09 ± 0,09
Día 21	1,03 ± 0,07	1,11 ± 0,09	1,05 ± 0,09	0,99 ± 0,08
% de cambio	-0,79 ± 2,62	-2,95 ± 2,33	-3,63 ± 3,02	-5,20 ± 7,06
% con relación a C <sup>2</sup>		8,89 ± 8,99	3,63 ± 9,39	0,11 ± 9,92
Diabéticos de tipo 2				
Día 0	0,97 ± 0,05	0,97 ± 0,06	0,99 ± 0,06	0,96 ± 0,04
Día 21	0,94 ± 0,06	0,99 ± 0,06	0,96 ± 0,06	0,96 ± 0,05
% de cambio	-3,28 ± 3,72	2,81 ± 2,40	-2,56 ± 2,69	0,55 ± 1,65
% con relación a C <sup>2</sup>		6,00 ± 3,51	2,97 ± 3,82	4,30 ± 3,42
Total				
Día 0	1,05 ± 0,05	1,05 ± 0,06	1,03 ± 0,05	1,03 ± 0,55
Día 21	0,99 ± 0,04	1,05 ± 0,06	1,01 ± 0,05	0,98 ± 0,05
% de cambio	-1,94 ± 2,20	-0,27 ± 1,73	-3,34 ± 2,01	-2,53 ± 3,84
% con relación a C <sup>2</sup>		7,59 ± 5,13	3,33 ± 5,37	1,99 ± 5,61
Relación LDL: HDL <sup>3,4</sup>				
No diabéticos				
Día 0	4,03 ± 0,36	3,97 ± 0,37	4,21 ± 0,36	3,69 ± 0,41
Día 21	3,78 ± 0,32	3,51 ± 0,31	3,40 ± 0,28	3,24 ± 0,28
% de cambio	-1,14 ± 1,38	0,42 ± 0,85	0,61 ± 1,76	-3,41 ± 2,52
% con relación a C <sup>2</sup>		-6,79 ± 3,33	-8,56 ± 3,60	-14,03 ± 2,92
Diabéticos de tipo 2				
Día 0	3,65 ± 0,25	3,72 ± 0,20	3,50 ± 0,26	3,67 ± 0,23
Día 21	3,56 ± 0,20	3,30 ± 0,23	3,12 ± 0,18	3,00 ± 0,16
% de cambio	2,38 ± 1,42	-0,71 ± 1,69	2,98 ± 1,20	5,70 ± 3,87
% con relación a C <sup>2</sup>		-7,12 ± 4,13	-11,69 ± 2,92	-16,61 ± 1,76
Total				
Día 0	3,87 ± 0,24	3,87 ± 0,23	3,92 ± 0,25	3,68 ± 0,26
Día 21	3,68 ± 0,19 <sup>a</sup>	3,41 ± 0,19 <sup>b</sup>	3,27 ± 0,17 <sup>bc</sup>	3,11 ± 0,17 <sup>c</sup>
% de cambio	0,30 ± 1,05	-0,43 ± 0,84	1,58 ± 1,16	0,32 ± 1,16
% con relación a C <sup>2</sup>		-6,94 ± 2,57 <sup>a</sup>	-10,01 ± 2,33 <sup>a</sup>	-15,23 ± 1,75 <sup>b</sup>
Relación TC:HDL <sup>4,5</sup>				
No diabéticos				
Día 0	5,71 ± 0,42	5,71 ± 0,46	5,87 ± 0,43	5,72 ± 0,43
Día 21	5,60 ± 0,40	5,42 ± 0,47	5,20 ± 0,41	5,02 ± 0,37

Lípido (mmol/l)	Testigo	Esteroles de plantas	Glucomanano	Combinación
% de cambio	-0,95 ± 0,74	0,22 ± 0,67	0,70 ± 1,37	-2,15 ± 1,88
% Con relación a C <sup>2</sup>		-3,59 ± 3,30	-6,61 ± 3,43	10,25 ± 2,30
Diabéticos de tipo 2				
Día 0	5,91 ± 0,30	5,92 ± 0,29	5,70 ± 0,36	5,84 ± 0,27
Día 21	5,71 ± 0,28	5,28 ± 0,28	5,20 ± 0,24	5,04 ± 0,21
% de cambio	1,75 ± 1,05*	- 0,76 ± 0,81	1,38 ± 0,88	2,91 ± 2,08
% Con relación a C <sup>2</sup>		-7,47 ± 2,78	-8,43 ± 2,67	-11,03 ± 2,51
Total				
Día 0	5,80 ± 0,26	5,81 ± 0,28	5,80 ± 0,28	5,77 ± 0,26
Día 21	5,65 ± 0,25 <sup>a</sup>	5,36 ± 0,28 <sup>a</sup>	-5,20 ± 0,24 <sup>bc</sup>	5,03 ± 0,22 <sup>c</sup>
% de cambio	0,24 ± 0,67	-0,21 ± 0,52	1,00 ± 0,85	0,08 ± 1,46
% con relación a C <sup>2</sup>		-5,33 ± 2,20 <sup>a</sup>	- 7,43 ± 2,21 <sup>ab</sup>	-10,60 ± 1,67 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Los valores están expresados como media ± SE. Los valores que portan letras en subíndices diferentes indican una diferencia significativa entre tratamientos (p < 0,05). El cambio porcentual está basado en satos individuales. El cambio porcentual con relación al testigo está basado en la media del día 21.

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; diferencia significativa del grupo no diabético.

<sup>2</sup>Tratamiento testigo

<sup>3</sup>Colesterol de lipoproteínas de baja densidad

<sup>4</sup>Colesterol de lipoproteínas de densidad elevada

<sup>5</sup> Colesterol total

Tabla 7. Niveles de esteroles de vegetales en plasma en el día 0 y el día 21 de cada período de tratamientos<sup>1</sup>

Fitoesterol (μmol/l)	Testigo	Esteroles vegetales	de	Glucomanano	Combinación
Campesterol					
No diabéticos					
Día 21	7,83 ± 0,83	7,35 ± 0,71		7,83 ± 0,91	7,34 ± 0,62
Diferencia <sup>2</sup>	0,65 ± 0,84	-0,86 ± 0,87		0,79 ± 0,72	-0,33 ± 0,85
Mmol/mol <sup>3</sup>	1,48 ± 0,18	1,45 ± 0,21		1,47 ± 0,17	1,66 ± 0,21
Diabéticos de tipo 2					
Día 21	5,59 ± 0,90	6,46 ± 0,91		5,83 ± 0,85	5,19 ± 0,85*
Diferencia <sup>2</sup>	-0,51 ± 0,49	0,20 ± 0,89		-0,20 ± 0,90'	-0,95 ± 0,96
Mmol/mol <sup>3</sup>	1,16 ± 0,24	1,29 ± 0,18		1,18 ± 0,16	1,08 ± 0,15*
Total					
Día 21	6,85 ± 0,64	6,96 ± 0,56		6,95 ± 0,65	6,40 ± 0,52
Diferencia <sup>2</sup>	0,13 ± 0,52	-0,39 ± 0,62		0,35 ± 0,56	-0,61 ± 0,63
Mmol/mol <sup>3</sup>	1,34 ± 0,15	1,38 ± 0,14		1,34 ± 0,12	1,41 ± 0,14
Latoesterol					
No diabéticos					
Día 21	4,65 ± 0,34	4,77 ± 0,52		4,96 ± 0,50	3,86 ± 0,22
Diferencia <sup>2</sup>	0,47 ± 0,40	0,49 ± 0,57		-1,48 ± 0,53	-1,30 ± 0,27

Fitoesterol ( $\mu\text{mol/l}$ )	Testigo	Esteroles vegetales	de	Glucomanano	Combinación
Mmol/mol <sup>3</sup>	0,88 $\pm$ 0,08	0,92 $\pm$ 0,13		0,94 $\pm$ 0,009	0,86 $\pm$ 0,09
Diabéticos tipo 2					
Día 21	4,25 $\pm$ 0,58	5,24 $\pm$ 0,47		5,03 $\pm$ 0,62	4,50 $\pm$ 0,28
Diferencia <sup>2</sup>	-1,25 $\pm$ 0,42	0,31 $\pm$ 0,59		-0,16 $\pm$ 0,51 <sup>n</sup>	-1,19 $\pm$ 0,72
Mmol/mol <sup>3</sup>	0,85 $\pm$ 0,13	1,06 $\pm$ 0,11		1,03 $\pm$ 0,12	0,94 $\pm$ 0,05
Total					
Día 21	4,47 $\pm$ 0,32	4,98 $\pm$ 0,35		4,99 $\pm$ 0,38	4,15 $\pm$ 0,18
Diferencia <sup>2</sup>	-0,33 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>	0,17 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>		-0,86 $\pm$ 0,38 <sup>ab</sup>	-1,25 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>
Mmol/mol <sup>3</sup>	0,86 $\pm$ 0,07	0,98 $\pm$ 0,09		0,98 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,06
$\beta$ -sitosterol					
No diabéticos					
Día 21	4,20 $\pm$ 0,61	6,08 $\pm$ 1,10		3,57 $\pm$ 0,51	4,68 $\pm$ 0,63
Diferencia <sup>2</sup>	0,07 $\pm$ 0,37	1,02 $\pm$ 0,51		-0,31 $\pm$ 0,23	0,82 $\pm$ 0,39
Mmol/mol <sup>3</sup>	0,78 $\pm$ 0,11	1,25 $\pm$ 0,28		0,69 $\pm$ 0,11	1,06 $\pm$ 0,18
Diabéticos tipo 2					
Día 21	4,92 $\pm$ 0,76	4,84 $\pm$ 1,04		4,09 $\pm$ 0,80	4,77 $\pm$ 0,85
Diferencia <sup>2</sup>	0,34 $\pm$ 0,42	0,30 $\pm$ 0,37		-0,13 $\pm$ 0,42	0,30 $\pm$ 0,35
mmol/mol <sup>3</sup>	0,99 $\pm$ 0,18	0,95 $\pm$ 0,20		0,82 $\pm$ 0,16	0,99 $\pm$ 0,17
Total					
Día 21	4,53 $\pm$ 0,47 <sup>ab</sup>	5,50 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>		3,81 $\pm$ 0,45 <sup>b</sup>	4,72 $\pm$ 0,51 <sup>ab</sup>
Diferencia <sup>2</sup>	0,20 $\pm$ 0,28	0,68 $\pm$ 0,32		-0,22 $\pm$ 0,23	6,57 $\pm$ 1,32
mmol/mol <sup>3</sup>	0,87 $\pm$ 0,10 <sup>ab</sup>	1,11 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>		0,75 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	1,03 $\pm$ 0,12 <sup>ab</sup>

<sup>1</sup>Los valores están expresados como media  $\pm$  SE. Los valores que portan letras en subíndices diferentes indican una diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). El cambio porcentual está basado en satos individuales. El cambio porcentual con relación al testigo está basado en la media del día 21.

\*  $p < 0,05$ ; diferencia significativa del grupo no diabético.

<sup>2</sup>Diferencia entre día 0 y día 21.

<sup>3</sup>Esterol de vegetales por 1 mol de colesterol.

Tabla 8. Niveles de insulina en plasma en el día 0 y el día 21 de cada período de tratamiento<sup>1</sup>

Insulina ( $\mu\text{U/ml}$ )	Testigo	Esteroles vegetales	de	Glucomanano	Combinación
No diabéticos					
Día 0	21,44 $\pm$ 2,61	21,30 $\pm$ 2,76		19,7 $\pm$ 1,39	22,31 $\pm$ 2,47
Día 21	22,08 $\pm$ 1,88	20,85 $\pm$ 1,52		19,21 $\pm$ 1,76	21,90 $\pm$ 2,53
% Cambio	13,42 $\pm$ 10,15	10,81 $\pm$ 10,49		-3,07 $\pm$ 4,96	1,91 $\pm$ 8,68
% con relación a C <sup>2</sup>		-0,74 $\pm$ 6,72		-78,28 $\pm$ 36,08	-1,07 $\pm$ 6,60
Diabéticos de tipo 2					
Día 0	39,31 $\pm$ 3,48 <sup>***</sup>	37,68 $\pm$ 4,01 <sup>**</sup>		39,03 $\pm$ 4,49 <sup>***</sup>	36,21 $\pm$ 4,68 <sup>**</sup>
Día 21	39,39 $\pm$ 4,00 <sup>***</sup>	40,18 $\pm$ 4,80 <sup>***</sup>		42,59 $\pm$ 4,94 <sup>***</sup>	34,51 $\pm$ 4,32 <sup>*</sup>
% Cambio	2,70 $\pm$ 6,82	15,09 $\pm$ 15,80		19,54 $\pm$ 16,45	5,66 $\pm$ 14,50

Insulina ( $\mu\text{U/ml}$ )	Testigo	Esteroles vegetales	de Glucomanano	Combinación
% con relación a C <sup>2</sup>		4,74 $\pm$ 11,25	-80,03 $\pm$ 35,65	-11,27 $\pm$ 6,98
Total				
Día 0	29,45 $\pm$ 2,68	28,64 $\pm$ 2,78	28,37 $\pm$ 2,78	28,54 $\pm$ 2,78
Día 21	29,84 $\pm$ 2,60	29,51 $\pm$ 2,90	29,69 $\pm$ 3,23	27,55 $\pm$ 2,62
% Cambio	8,62 $\pm$ 6,36	12,73 $\pm$ 8,98	7,07 $\pm$ 7,99	3,59 $\pm$ 7,92
% con relación a C <sup>2</sup>		1,71 $\pm$ 6,16 <sup>b</sup>	-79,7 $\pm$ 25,08 <sup>a</sup>	-5,64 $\pm$ 4,81 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Los valores están expresados como media  $\pm$  SE. Los valores que portan letras en subíndices diferentes indican una diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). El cambio porcentual está basado en satos individuales. El cambio porcentual con relación al testigo está basado en la media del día 21.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; diferencia significativa del grupo no diabético.

<sup>2</sup>Tratamiento testigo

Tabla 9. Niveles de Fructosamina en suero en el día 0 y el día 21 para cada período de tratamiento<sup>1</sup>

Fructosamina ( $\mu\text{mol/g}$ )	Testigo	Esteroles vegetales	de Glucomanano	Combinación
No diabéticos				
Día 0	3,38 $\pm$ 0,07	3,39 $\pm$ 0,07	3,44 $\pm$ 0,07	3,48 $\pm$ 0,09
Día 21	3,40 $\pm$ 0,08	3,38 $\pm$ 0,06	3,42 $\pm$ 0,06	3,40 $\pm$ 0,08
% Cambio	0,15 $\pm$ 0,85	0,08 $\pm$ 1,42	-0,33 $\pm$ 1,10	-2,02 $\pm$ 1,21
% con relación a C <sup>2</sup>		0,65 $\pm$ 1,83	1,26 $\pm$ 1,02	1,39 $\pm$ 1,58
Diabéticos de tipo 2				
Día 0	4,08 $\pm$ 0,18***	4,00 $\pm$ 0,19**	4,05 $\pm$ 0,16***	4,10 $\pm$ 0,17**
Día 21	4,01 $\pm$ 0,16**	3,94 $\pm$ 0,18**	3,92 $\pm$ 0,14***	3,95 $\pm$ 0,13**
% cambio	-1,42 $\pm$ 1,41	-1,32 $\pm$ 1,04	-2,87 $\pm$ 0,92	-3,28 $\pm$ 1,83
% con relación a C <sup>2</sup>		-1,68 $\pm$ 1,79	-1,86 $\pm$ 0,92	-0,91 $\pm$ 2,46
Total				
Día 0	3,69 $\pm$ 0,11	3,66 $\pm$ 0,11	3,71 $\pm$ 0,10	3,76 $\pm$ 0,11
Día 21	3,68 $\pm$ 0,10	3,63 $\pm$ 0,10	3,65 $\pm$ 0,08	3,65 $\pm$ 0,09
% Cambio	-0,58 $\pm$ 0,80	-0,55 $\pm$ 0,91	-1,47 $\pm$ 0,76	-2,58 $\pm$ 1,04
% con relación a C <sup>2</sup>		-0,43 $\pm$ 1,28	-0,19 $\pm$ 0,74	0,32 $\pm$ 1,41

<sup>1</sup>Los valores están expresados como media  $\pm$  SE. Los valores que portan letras en subíndices diferentes indican una diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). El cambio porcentual está basado en satos individuales. El cambio porcentual con relación al testigo está basado en la media del día 21.

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; diferencia significativa del grupo no diabético.

<sup>2</sup>Tratamiento testigo

#### Referencias:

1. Levi Ri Declining Mortality in Coronary Hear Diseases Atherosclerosis 1981 1 312-325

5 2. Law M. R., Wald N. J., Wu., Hacksaw ZA., Bailey A.; Systemic underestimation of association between serum cholesterol concentration and ischemic heart disease in observational studies: Data from BUPA Study; Br. Med. J. 1994; 308: 363-366

3. Law M. R., Wald N. J., Thompson S. G.; By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischemic heart disease? Br. Med. J. 1994; 308: 367-373

4. La Rosa J. C., Hunninghake D., Bush D. et al. ; The cholesterol facts: A summary of the evidence relating to

- dietary fats, serum cholesterol and coronary heart disease: A joint statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung and Blood Institute. *Circulation* 1990; 81: 1721-1733
5. Havel R. J., Rapaport E.. Drug Therapy: Management of Primary Hyperlipidemia. *New England Journal of Medicine*, 1995; 332: 1491-1498
- 5 6. Lees A. M., Mok H. Y. I., Lees R. S., McCluskey M. A., Grundy S. M. Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis* 1977; 28: 325-338
7. *New Eng. J. Med.*, 336,973-9 (1999)
8. *J. Path.* 181,93-9 (1997)
9. Liese AD et al. Development of the Insulin Resistance Syndrome: An Epidemiological Perspective *Epidemiol. Rev* 20: 157-172,1998
- 10 10. Trevisan M. Lui J, Bahsas FB et al: Syndrome X and Mortality: a population based study. *Am J Epidemiol* 148: 958-966,1998
11. Wing M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP: Effects of Diabetes and Level of Glycemia on All-Cause and Cardiovascular Mortality. *Diabetes Care* 21: 1167-1172,1998
- 15 12. Gu K, Cowie CC, Harris MI: Mortality in Adults with and without Diabetes in a National Cohort of the US Population, 1971-1993 *Diabetes Care* 21: 1138-1145, 1998
13. Savage PJ: Cardiovascular Complications of Diabetes Mellitus: what we know and what we need to know about prevention. *Am J. Intern Med.* 124: 123-126, 1996
- 20 14. Kiriya S, Enishi A, Yoshida A, Suhiyama N and Shimahara H. Hypercholesterolemic activity and molecular weight of Konjak Mannan. *Nutri Reports Intl.* 6: 231-236,1972
15. Staianno A, Simeone D, Giudice ED et al. Effect of Dietary FibreGlucomannan on Chronic Constipation in Neurologically impaired children. *J. Pediatr* 136: 41-50,2000
16. Melga P, Giusto M, Ciuchi E et al. Dietary Fibre in the dietetic therapy of diabetes mellitus. Experimental data with purified glucomannans. *Riv. Eur. Sci. Med. Farmacol*, 14: 367-373.1992
- 25 17. Cesa F, Mariani S, Fava A, et al. The use of vegetable fibres in the treatment of pregnancy related diabetes and/or excessive weight gain during pregnancy. *Minerva Ginecol.* 42: 271-274.1990
18. Arvill A, Bodin L. Effect of short term ingestion of Kojak glucomannan on serum cholesterol in healthy men. *Am J. Clin Nutr* 69: 30-42, 1999
- 30 19. Shima K. Tanaka A, Ikegami H, Tabata M, Sawazaki N, Kumahara Y: Effect of dietary fibre, glucomannan, on absorption of sulfonyleurea in man. *Horm Metab Res* 15: 1-3, 1983
20. Hopman WP, Houben PG, Speth PA, Larmers CB. Glucomannan prevents postprandial hypoglycemia in patients with previous gastric surgery. *Gut.* 1988 ; 29: 930-934.
21. Scalfi L, Coltorti A, D'Arrigo E, Carandente V, Mazzacano C, Di Palo M, Contaldo F. Effect of dietary fibre on postprandial thermogenesis. *Int J Obes.* 1987; 11: 95-99.
- 35 22. Huang CY, Zhang MY, Peng SS, Hong JR, Wang X, Jiang HJ, Zhang FL, Bai YX, Liang JZ, Yu YR et al. Effect of konjac food on blood glucose level in patients with diabetes. *Biomed Environ Sci.* 1990; 3: 123-132.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para ser incorporada en alimentos, bebidas, complementos nutritivos o vitamínicos y nutracéuticos, que comprende uno o más fitoesteroles y/o fitoestanoles y, adicionalmente, glucomanano, en que el fitoesterol y/o el fitoestanol en la composición comprenden 67,3% de sitoesterol, 10,8% de sitoestanol, 8,2% de campesterol, 1,6% de campestanol y 12,1% de otros.
2. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el fitoesterol y/o fitoestanol proceden de alquitrán de aceite de resina.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1, en la que los fitoesteroles y/o fitoestanoles están en formas seleccionadas entre el grupo que consiste en: ésteres de ácidos alifáticos, ésteres de ácidos aromáticos, ésteres de ácidos fenólicos, ésteres de cinamatos, ésteres de ferulatos, fitoesterol/fitoestanol-glicócidos y fitoesterol/fitoestanol/acilglicócidos.
- 15 4. Uso de una combinación que comprende uno o más fitoesteroles y/o fitoestanoles y adicionalmente glucomanano, en la fabricación de un profiláctico o medicamento para tratar o prevenir la aterosclerosis, estados hiperlipidémicos, dislipidemia o diabetes de tipo II, hipoalfalipoproteinemia, hipertensión, hipercolesterolemia y obesidad visceral en un animal, en que el fitoesterol y/o el fitoestanol en la composición comprenden 67,3% de sitoesterol, 10,8% de sitoestanol, 8,2% de campesterol, 1,6% de campestanol y 12,1% de otros.
- 20 5. El uso de la reivindicación 4, en el que la cantidad de fitoesterol y/o fitoestanol es de al menos 0,8 g/día y la cantidad de glucomanano es hasta 13 g/día basado en un ser humano individual de 70 kg.
6. El uso de la reivindicación 5, en el que la cantidad de fitoesterol y/o fitoestanol es de 1,3 g/día y la cantidad de glucomanano usado es de 2-10 g/día.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, para tratar o prevenir una enfermedad cardiovascular y/o sus estados asociados en un animal.
8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en que el fitoesterol y/o fitoestanol y glucomanano usados están en la forma de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 25 9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que el animal es un ser humano.
10. El uso según la reivindicación 9, en el que el ser humano tiene diabetes de tipo II.
11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en el que el tratamiento consigue adicionalmente al menos uno de los siguientes objetivos terapéuticos en el animal: rebajar el colesterol de LDL en suero, aumentar el colesterol de HDL en suero y disminuir los triglicéridos en suero.
- 30 12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en el que el tratamiento disminuye la ganancia de peso o aumenta la pérdida de peso en el animal.
13. Un producto que es un alimento funcional, una bebida, un complemento nutritivo o vitamínico o un nutracéutico, que comprende la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
14. Un producto según la reivindicación 13, que es un alimento.
- 35 15. Un producto según la reivindicación 13, que es una bebida.

Fig. 1. Cambios semanales de los niveles totales de colesterol

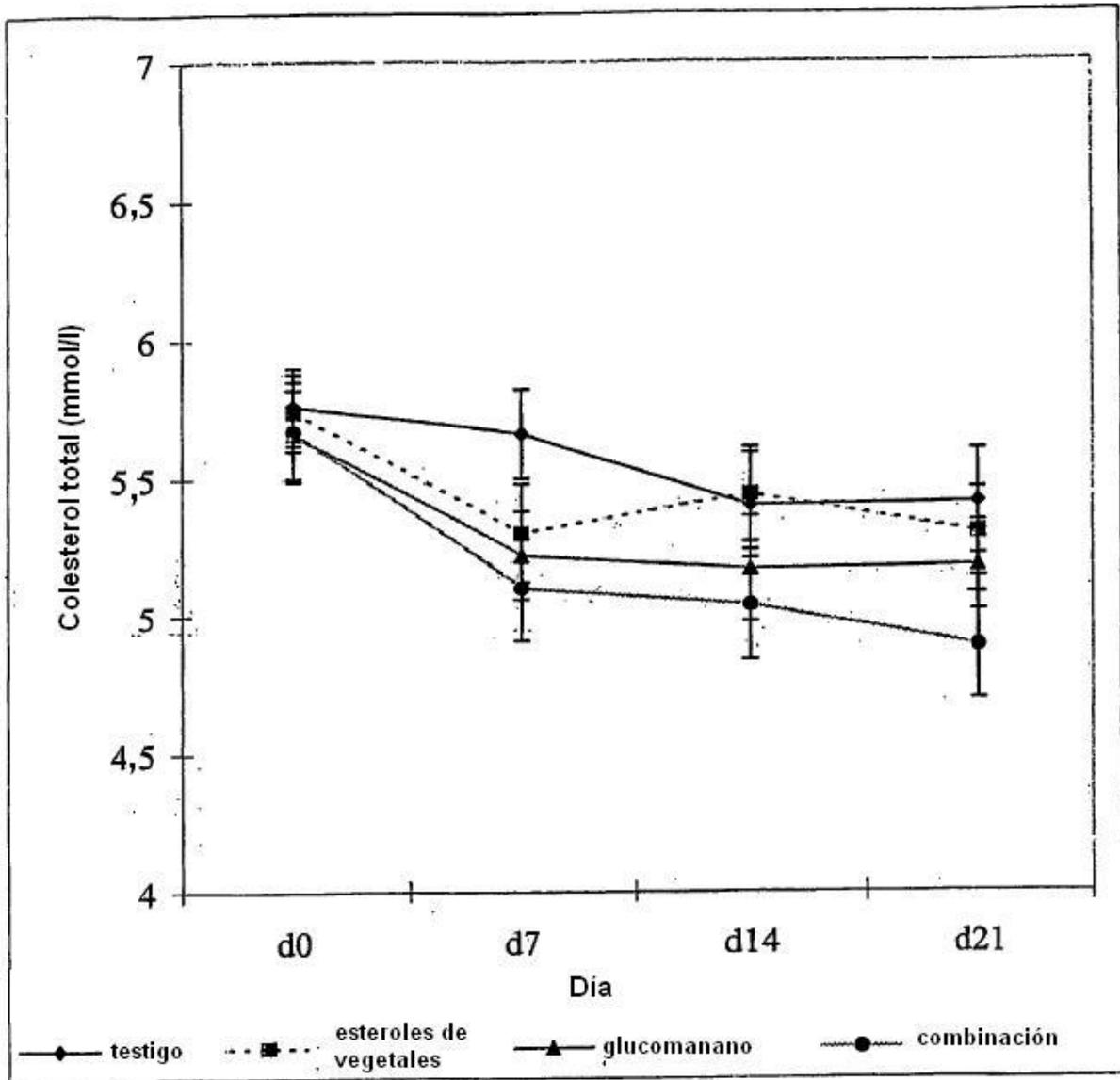
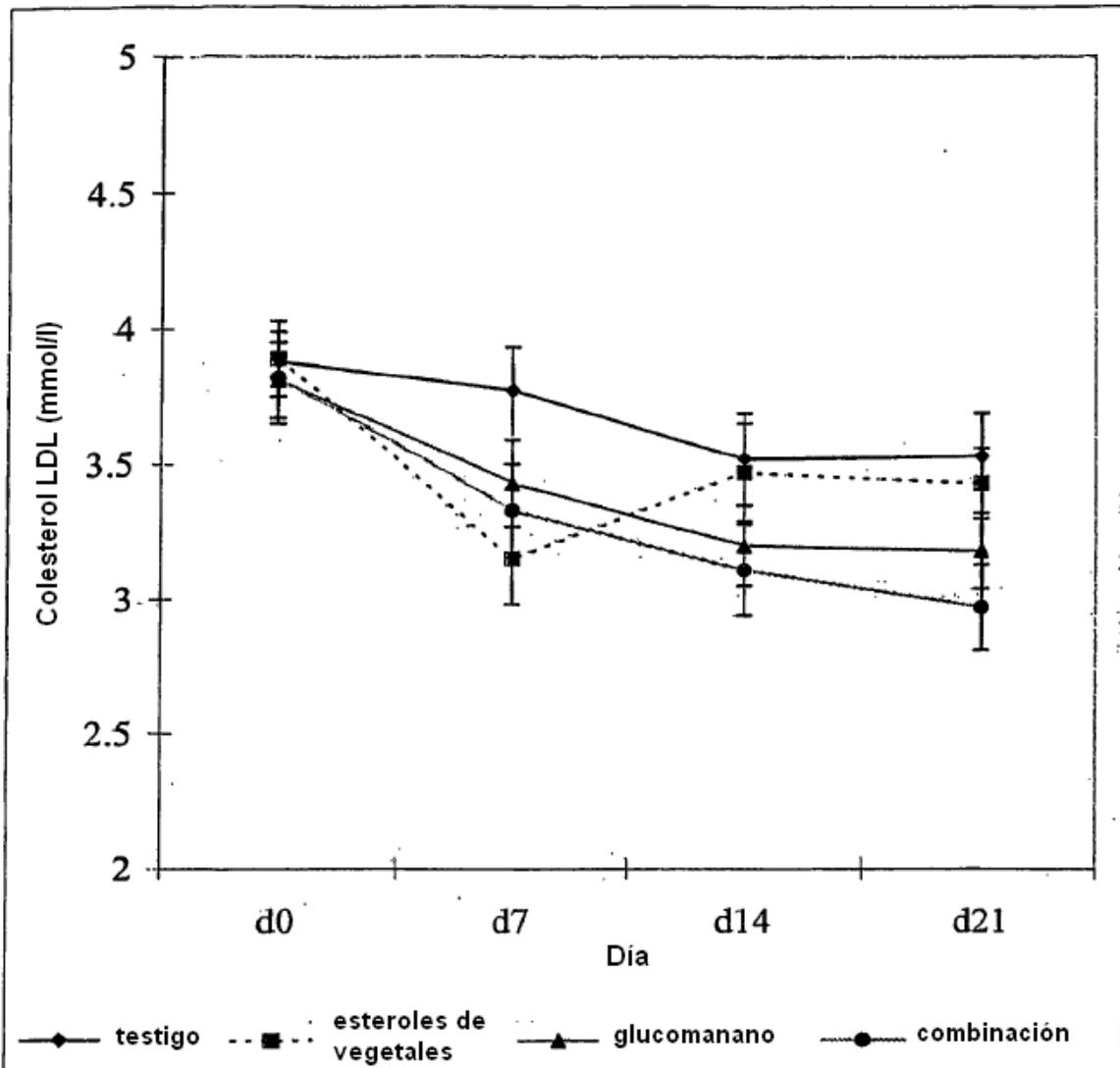


Fig. 2. Cambios semanales de colesterol LDL



Abreviatura: LDL - lipoproteínas de baja densidad

Figura 3. Cambios de glucosa en sangre durante 2 horas. Ensayo de tolerancia de 50 g de glucosa

